

**DIE BESTÄTIGUNG DER STRUKTUR VON
5,10-METHYLEN-(6R,S)-5,6,7,8-TETRAHYDRO-L-FOLSÄURE
UND IHRE UMWANDLUNG IN
5-METHYL-(6R,S)-5,6,7,8-TETRAHYDRO-L-FOLSÄURE**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung
der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich**

**von
ROGER KALBERMATTEN
von St. Niklaus VS**

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. M. Viscontini

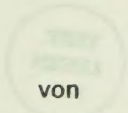
1982

**Zürich 1981
Zentralstelle der Studentenschaft**

**DIE BESTÄTIGUNG DER STRUKTUR VON
5,10-METHYLEN-(6R,S)-5,6,7,8-TETRAHYDRO-L-FOLSÄURE
UND IHRE UMWANDLUNG IN
5-METHYL-(6R,S)-5,6,7,8-TETRAHYDRO-L-FOLSÄURE**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung
der Philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der Universität Zürich**


von

**ROGER KALBERMATTEN
von St. Niklaus VS**

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. M. Viscontini

**Zürich 1981
Zentralstelle der Studentenschaft**



Meinem Lehrer,

Herrn Prof. Dr. M. Viscontini,

unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit
ausgeführt wurde, danke ich herzlich für
die grosszügige Unterstützung und die zahl-
reichen wertvollen Anregungen.

Ich danke Herrn Dr. W. Städeli (Abteilung Prof. v. Philipsborn)
für die Aufnahme der ^{15}N - und ^{13}C -NMR.-Spektren und die
Mithilfe bei deren Interpretation, sowie für die wertvollen
Diskussionen.

Herrn H. Frohofer, Leiter der mikroanalytischen Abteilung,
danke ich für die Ausführung der Elementaranalysen.

Table of Contents

Einleitung	1
I. Die Entwicklung der Philosophie	10
1. Die Philosophie als Wissenschaft	10
2. Die Philosophie als Lebensweise	15
3. Die Philosophie als Kunst	20
4. Die Philosophie als Religion	25
5. Die Philosophie als Politik	30
6. Die Philosophie als Ethik	35
7. Die Philosophie als Ästhetik	40
8. Die Philosophie als Logik	45
9. Die Philosophie als Metaphysik	50
10. Die Philosophie als Epistemologie	55
11. Die Philosophie als Hermeneutik	60
12. Die Philosophie als Linguistik	65
13. Die Philosophie als Psychologie	70
14. Die Philosophie als Soziologie	75
15. Die Philosophie als Anthropologie	80
16. Die Philosophie als Kosmologie	85
17. Die Philosophie als Theologie	90
18. Die Philosophie als Naturwissenschaft	95
19. Die Philosophie als Technikwissenschaft	100
20. Die Philosophie als Umweltwissenschaft	105
21. Die Philosophie als Informationswissenschaft	110
22. Die Philosophie als Medienwissenschaft	115
23. Die Philosophie als Kulturwissenschaft	120
24. Die Philosophie als Geschichtswissenschaft	125
25. Die Philosophie als Rechtswissenschaft	130
26. Die Philosophie als Wirtschaftswissenschaft	135
27. Die Philosophie als Gesundheitswissenschaft	140
28. Die Philosophie als Sportwissenschaft	145
29. Die Philosophie als Pädagogik	150
30. Die Philosophie als Erziehungswissenschaft	155
31. Die Philosophie als Sozialwissenschaft	160
32. Die Philosophie als Politikwissenschaft	165
33. Die Philosophie als Verwaltungswissenschaft	170
34. Die Philosophie als Jurisprudenz	175
35. Die Philosophie als Medizin	180
36. Die Philosophie als Zahnmedizin	185
37. Die Philosophie als Pharmazie	190
38. Die Philosophie als Biologie	195
39. Die Philosophie als Chemie	200
40. Die Philosophie als Physik	205
41. Die Philosophie als Astronomie	210
42. Die Philosophie als Geographie	215
43. Die Philosophie als Meteorologie	220
44. Die Philosophie als Klimatologie	225
45. Die Philosophie als Umweltökologie	230
46. Die Philosophie als Naturschutzwissenschaft	235
47. Die Philosophie als Landschaftsarchitektur	240
48. Die Philosophie als Stadtplanung	245
49. Die Philosophie als Architektur	250
50. Die Philosophie als Kunstgeschichte	255
51. Die Philosophie als Musikwissenschaft	260
52. Die Philosophie als Theaterwissenschaft	265
53. Die Philosophie als Filmwissenschaft	270
54. Die Philosophie als Medienwissenschaft	275
55. Die Philosophie als Kommunikationswissenschaft	280
56. Die Philosophie als Informationswissenschaft	285
57. Die Philosophie als Bibliothekswissenschaft	290
58. Die Philosophie als Archivwissenschaft	295
59. Die Philosophie als Dokumentationswissenschaft	300
60. Die Philosophie als Informationsmanagement	305
61. Die Philosophie als Informationspolitik	310
62. Die Philosophie als Informationsrecht	315
63. Die Philosophie als Informationsethik	320
64. Die Philosophie als Informationsökonomie	325
65. Die Philosophie als Informationsökologie	330
66. Die Philosophie als Informationsökonomie	335
67. Die Philosophie als Informationsökologie	340
68. Die Philosophie als Informationsökonomie	345
69. Die Philosophie als Informationsökologie	350
70. Die Philosophie als Informationsökonomie	355
71. Die Philosophie als Informationsökologie	360
72. Die Philosophie als Informationsökonomie	365
73. Die Philosophie als Informationsökologie	370
74. Die Philosophie als Informationsökonomie	375
75. Die Philosophie als Informationsökologie	380
76. Die Philosophie als Informationsökonomie	385
77. Die Philosophie als Informationsökologie	390
78. Die Philosophie als Informationsökonomie	395
79. Die Philosophie als Informationsökologie	400
80. Die Philosophie als Informationsökonomie	405
81. Die Philosophie als Informationsökologie	410
82. Die Philosophie als Informationsökonomie	415
83. Die Philosophie als Informationsökologie	420
84. Die Philosophie als Informationsökonomie	425
85. Die Philosophie als Informationsökologie	430
86. Die Philosophie als Informationsökonomie	435
87. Die Philosophie als Informationsökologie	440
88. Die Philosophie als Informationsökonomie	445
89. Die Philosophie als Informationsökologie	450
90. Die Philosophie als Informationsökonomie	455
91. Die Philosophie als Informationsökologie	460
92. Die Philosophie als Informationsökonomie	465
93. Die Philosophie als Informationsökologie	470
94. Die Philosophie als Informationsökonomie	475
95. Die Philosophie als Informationsökologie	480
96. Die Philosophie als Informationsökonomie	485
97. Die Philosophie als Informationsökologie	490
98. Die Philosophie als Informationsökonomie	495
99. Die Philosophie als Informationsökologie	500
100. Die Philosophie als Informationsökonomie	505

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	Seite 11
A. ALLGEMEINER TEIL	12
1. Einleitung	13
2. Die Bedeutung der Tetrahydrofolsäure-Derivate im C ₁ -Stoffwechsel	15
2.1. Uebersicht	15
2.2. Die C ₁ -FH ₄ -Derivate und ihre gegenseitige Umwandlung	17
2.3. C ₁ -Uebertragungen im Anabolismus	20
2.4. C ₁ -Uebertragungen im Katabolismus	26
2.5. Der Mechanismus der Glycin/L-Serin- Umwandlung	28
2.6. Der Mechanismus der Thymidylat Synthese	33
B. Die BESTÄTIGUNG DER STRUKTUR VON 5,10-METHYLEN- (6R,S)-5,6,7,8-TETRAHYDRO-L-FOLSAEURE	42
1. Die Entdeckung von CH ₂ -FH ₄	43
1.1. Uebersicht	43
1.2. Aktiver Formaldehyd als Cofaktor bei der Umwandlung von Glycin in L-Serin	44
1.3. Die chemische Synthese von aktivem Form- aldehyd: Dissoziationskonstante	45
1.4. Die Synthese von aktivem Formaldehyd durch chemische Reduktion von CH ⁺ -FH ₄	48
1.5. Die Kinetik der Reaktion von Formaldehyd mit FH ₄	49
1.6. ¹ H-NMR.-Daten	51
1.7. Diskussion	52

2. Die Bestätigung der Struktur von 5,10-Methylen-	
(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure	55
2.1. ^{13}C -NMR.-Spektrum von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$	56
2.2. ^{15}N -NMR.-Spektren von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ und FH_4	59
2.3. ^{13}C -NMR.-Spektrum von c(11),n(5),n(10)- $\text{CH}_2\text{-FH}_4$	62
2.4. ^{15}N -NMR.-Spektren von c(11),n(5),n(10)- $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ und n(5),n(10)- $\text{CH}_2\text{-FH}_4$	67
2.5. Die Konformation von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$	69
3. Die Reaktion von FH_4 mit einem Formaldehyd-	
Ueberschuss	70
3.1. ^{13}C -NMR.-Spektrum von <u>38</u>	38
3.2. Die Reduktion der 5,10-Methylenbrücke durch Formaldehyd	75
4. Experimenteller Teil	76
5. Zusammenfassung	79
C. DIE SYNTHESE VON 5-METHYL-(6R,S)-5,6,7,8-TETRAHYDRO-	
L-FOLSAEURE	80
1. Einleitung	81
2. Die Synthese von 5- $\text{CH}_3\text{-FH}_4$	83
3. Experimenteller Teil	87
4. Zusammenfassung	90
D. LITERATURVERZEICHNIS	91

Verzeichnis der Abkürzungen

FH_2	: 7,8-Dihydro-L-folsäure
FH_4	: (6S)*-5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure
$5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$	: 5-Methyl-(6S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure
5-CHO-FH_4	: 5-Formyl-(6S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure
$5\text{-CH}_2^+\text{=FH}_4$	: 5-Methylenimmonium-(6S)-5,6,7,8-terahydro-L-folsäure
5-CH=NH-FH_4	: 5-Formimino-(6S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure
10-CHO-FH_4	: 10-Formyl-(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure
$\text{CH}_2\text{-FH}_4$	: 5,10-Methylen-(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure
$\text{CH}^{\text{f}}\text{-FH}_4$	: 5,10-Methenyl-(6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure

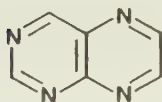
* Es sind jeweils die Konfigurationen der natürlich vorkommenden Verbindungen angegeben

A. Allgemeiner Teil

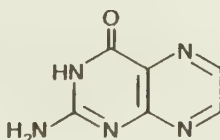
1. Einleitung

Die Pterine und die Derivate der Folsäure bilden eine Gruppe von Naturstoffen, deren Vertreter in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren vorkommen [1].

Das gemeinsame Grundgerüst dieser Verbindungen ist Pteridin, ein Heterobicyclus mit der systematischen Bezeichnung Pyrimido-[4,5-b]-pyrazin.



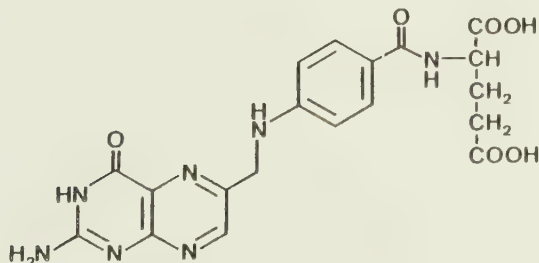
Pteridin



Pterin

Alle natürlichen Pterine sind Derivate von 2-Amino-4-hydroxypteridin, dem sogenannten Pterin. Der Name Pterin stammt vom griechischen Pteron = Flügel und erinnert damit an Schmetterlingsflügel, wo Pterine als Pigmente auftreten, und woraus sie erstmals isoliert wurden.

Das bedeutendste Pterin ist die L-Folsäure mit ihren Derivaten.



L-Folsäure

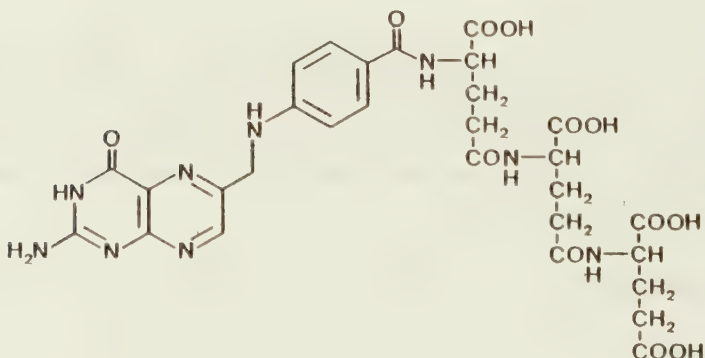
Sie ist aus drei Untereinheiten aufgebaut:

6-Methylpterin, p-Aminobenzoessäure und L-Glutaminsäure.

Die systematische Bezeichnung lautet: N-[4-[(2-Amino-4-hydroxy-6-pteridiny]methyl]amino]benzoyl]-L-glutaminsäure.

In der älteren angelsächsischen Literatur findet man auch den Begriff Pteroyl-L-glutaminsäure. Der heute gebräuchliche Name L-Folsäure leitet sich vom lateinischen Folium = Blatt ab und deutet damit die Quelle an (Spinatblätter), woraus diese Substanz ursprünglich unter anderem isoliert wurde.

Viele natürlich vorkommenden Folsäure-Derivate enthalten zwei bis sieben L-Glutaminsäurereste. Jeder L-Glutaminsäurerest ist jeweils durch seine Aminogruppe mit der γ -Carboxylgruppe des vorangehenden peptidisch verknüpft.

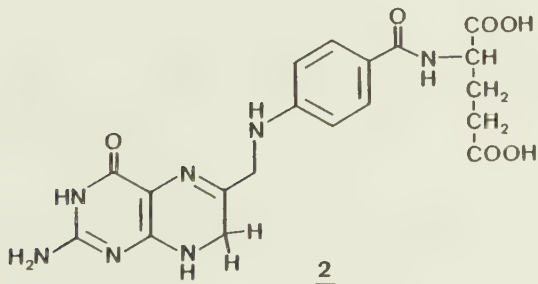
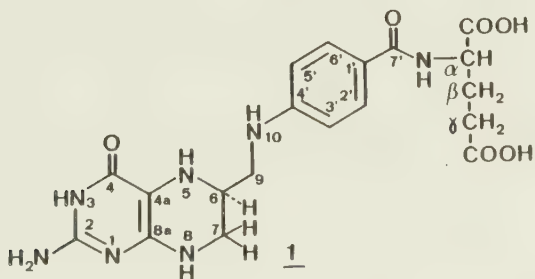


2. Die Bedeutung der Tetrahydrofolsäure-Derivate im C_1 -Stoffwechsel

2.1. Uebersicht

In verschiedenen metabolischen Sequenzen, die zur Bildung oder zum Abbau von Purinen, Pyrimidinen und Aminosäuren führen, treten Stufen auf, bei denen ein Kohlenstoffatom auf der Oxidationsstufe der Ameisensäure, des Formaldehyds oder des Methanols übertragen wird.

Bei solchen C_1 -Uebertragungsreaktionen nehmen (6S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (1) und ihre Derivate als Coenzym teil [1,2,3].



1 entsteht durch die enzymatische Reduktion von 7,8-Dihydro-L-folsäure (2), die von Dihydrofolsäure-Reduktase katalysiert wird. Dabei wird nur eines der beiden möglichen (6S bzw. 6R) Diastereomeren gebildet. Die Röntgenstrukturanalyse der natürlich vorkommenden 5,10-Methenyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure wurde kürzlich gelöst [4]. Für C(6) ergibt sich dort die R-Konfiguration, was in 1 der S-Konfiguration entspricht.

7,8-Dihydro-L-folsäure selber geht entweder direkt aus der Biosynthese des Folsäuregerüsts hervor, oder entsteht durch die Reduktion von Folsäure, die ebenfalls von Dihydrofolsäure-Reduktase katalysiert wird.

Mit der Abkürzung FH_4 wird die 5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure, sowie ihre dianionische Form, die bei physiologischem pH vorliegt, bezeichnet, wobei die Stereochemie an C(6) nicht näher spezifiziert ist. In dieser Arbeit verwenden wir FH_4 sowohl für die natürliche 6S-Form, als auch für das, durch chemische Reduktion erhaltene 6R,S-Diastereomerengemisch.

FH_2 wird als Kurzform für 7,8-Dihydro-L-folsäure verwendet.

2.2. Die C₁-FH₄-Derivate und ihre gegenseitige Umwandlung

Die Coenzym-Funktion von FH₄ besteht darin, dass die Ein-Kohlenstoffgruppe (C₁-Gruppe) eines C₁-Donors auf FH₄ übertragen und durch N(5) und/oder N(10) kovalent gebunden wird, um sie dann an einen C₁-Akzeptor abzugeben.



Eine wesentliche Bedeutung von FH₄ bei den C₁-Übertragungen liegt darin, dass die C₁-Gruppe des Donor- und des Akzeptor-metaboliten nicht die gleiche Oxidationszahl haben muss.

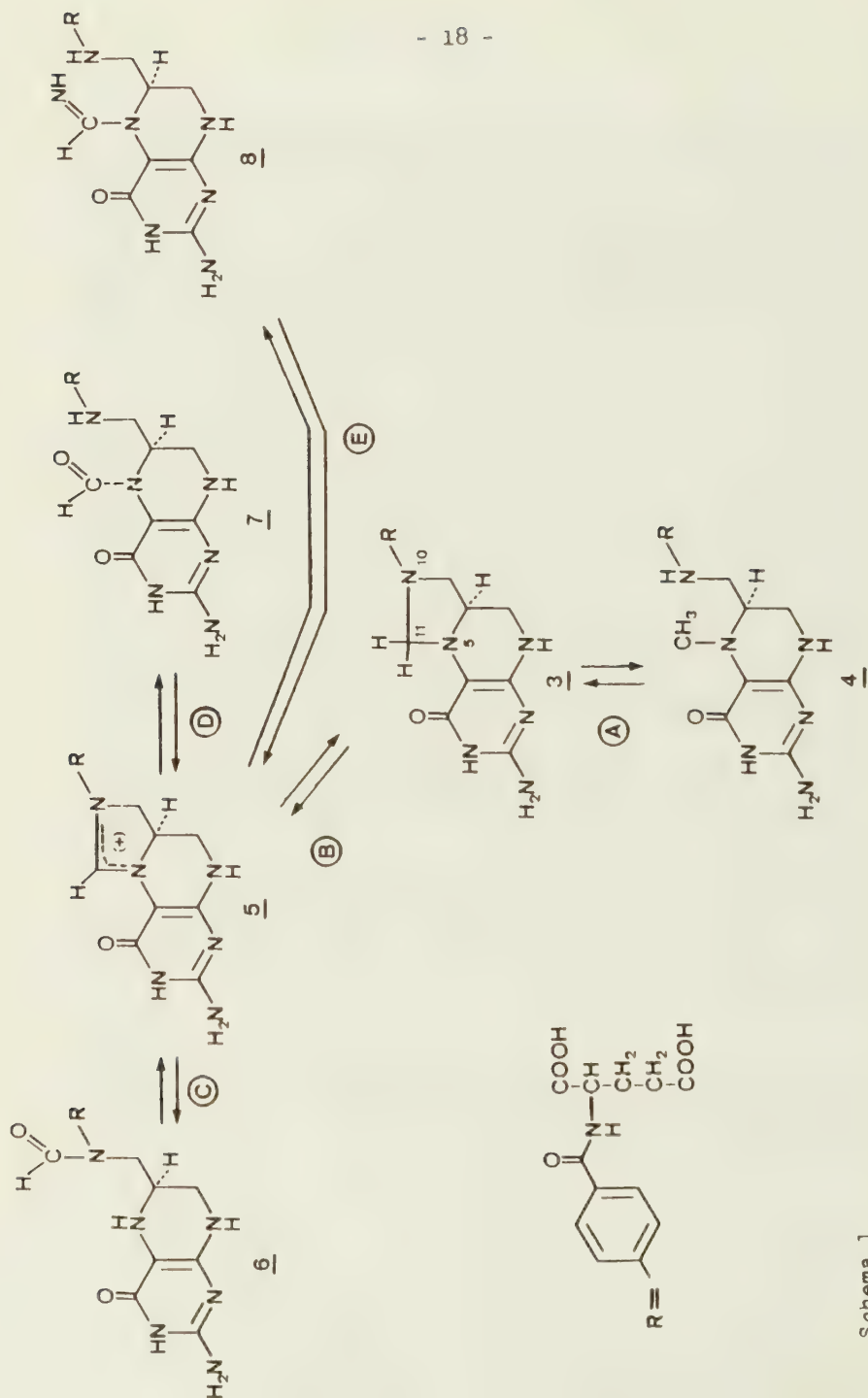
Das übertragbare Kohlenstoffatom in C₁-FH₄ kann enzymatisch in die unterschiedlichen Oxidationsstufen umgewandelt werden. Dementsprechend bezeichnet C₁-FH₄ Tetrahydrofolsäure-Derivate mit kovalent gebundenen C₁-Gruppen auf der Oxidationsstufe von Ameisensäure, Formaldehyd oder Methanol.

Die verschiedenen Zustände von C₁-FH₄ und ihre gegenseitige Umwandlung sind in Schema 1 vorgestellt. Die ausgeschriebenen Namen befinden sich auf S.11.

Auf der Oxidationsstufe von Ameisensäure findet man

CH⁺-FH₄ (5); 10-CHO-FH₄ (6); 5-CHO-FH₄ (7); 5-CH=NH-FH₄ (8), auf derjenigen von Formaldehyd CH₂-FH₄ (3), und auf derjenigen von Methanol 5-CH₃-FH₄ (4).

In allen enzymatischen Reaktionen sind jeweils nur diejenigen FH₄-Derivate aktiv, welche die in Schema 1 angegebene Stereochemie an C(6) besitzen.



Scheme 1

Die unten aufgeführten Enzyme, welche die Reaktionen A - E in Schema 1 katalysieren, wurden in zahlreichen Bakterien und Wirbeltieren, in letzteren hauptsächlich in der Leber, gefunden.

A: 5,10-Methylenetetrahydrofolsäure-Reduktase



FAD(H₂) ist kovalent an die Reduktase gebunden. FAD wird durch NAD(P)H wieder reduziert.

B: 5,10-Methylenetetrahydrofolsäure-Dehydrogenase



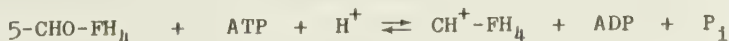
Das Hydrid wird stereospezifisch entfernt und stereospezifisch auf Nikotinamid übertragen.

C: 5,10-Methenyltetrahydrofolsäure-Cyclohydrolase

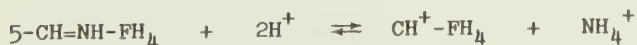


Diese Umwandlung findet auch nicht-enzymatisch statt. Bei pH 7 liegt das Gleichgewicht ungefähr in der Mitte.

D: 5-Formyltetrahydrofolsäure-Cyclodehydase



E: 5-Formiminotetrahydrofolsäure-Cyclodeaminase



*Nicht erläuterte Abkürzungen sind solche, die in der biochemischen Literatur allgemein verwendet werden.

2.3. C₁-Uebertragungen im Anabolismus

Die in der Biosynthese von L-Methionin (Met), Glycin (Gly), Desoxythymidylat (dTMP) und Inosinat (IMP) vorkommenden C₁-Uebertragungen sind in Schema 2 zusammengefasst, in welchem die Abwesenheit von Gleichgewichtspfeilen nicht bedeutet, dass die Reaktionen irreversibel sind. Es wurde dort eine leicht überschaubare Darstellung des Weges der C₁-Fragmente (mit einem Punkt versehene Kohlenstoffatome) via FH₄-Derivate angestrebt.

a) CH₂-FH₄

Fast alle durch FH₄-Derivate übertragenen Kohlenstoffatome haben letztlich ihren Ursprung in C(3) von L-Serin.

Die in der von Serin-Transhydroxymethylase katalysierten Reaktion



entstandene CH₂-FH₄ nimmt unter den C₁-FH₄-Derivaten eine zentrale Stellung ein. Sie kann ihre C₁-Gruppe, die auf der Oxidationsstufe des Formaldehyds steht, entweder direkt übertragen, oder durch Oxidation bzw. Reduktion (Schema 1) in einen, für andere Uebertragungen geeigneten Zustand erheben.

L-Serin entsteht aus 3-Phosphoglycerinsäure, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, gemäss der folgenden Sequenz:



Damit ist der Weg vom Vorläufer D-Glucose zum C₁-Fragment aufgezeigt.

Durch seine Verwendung als C_1 -Quelle wird Serin in Glycin übergeführt. Glycin kann aber auch in der von Glycin-Synthetase katalysierten Reaktion gebildet werden, wobei CH_2-FH_4 das α -C-Atom von Glycin liefert.



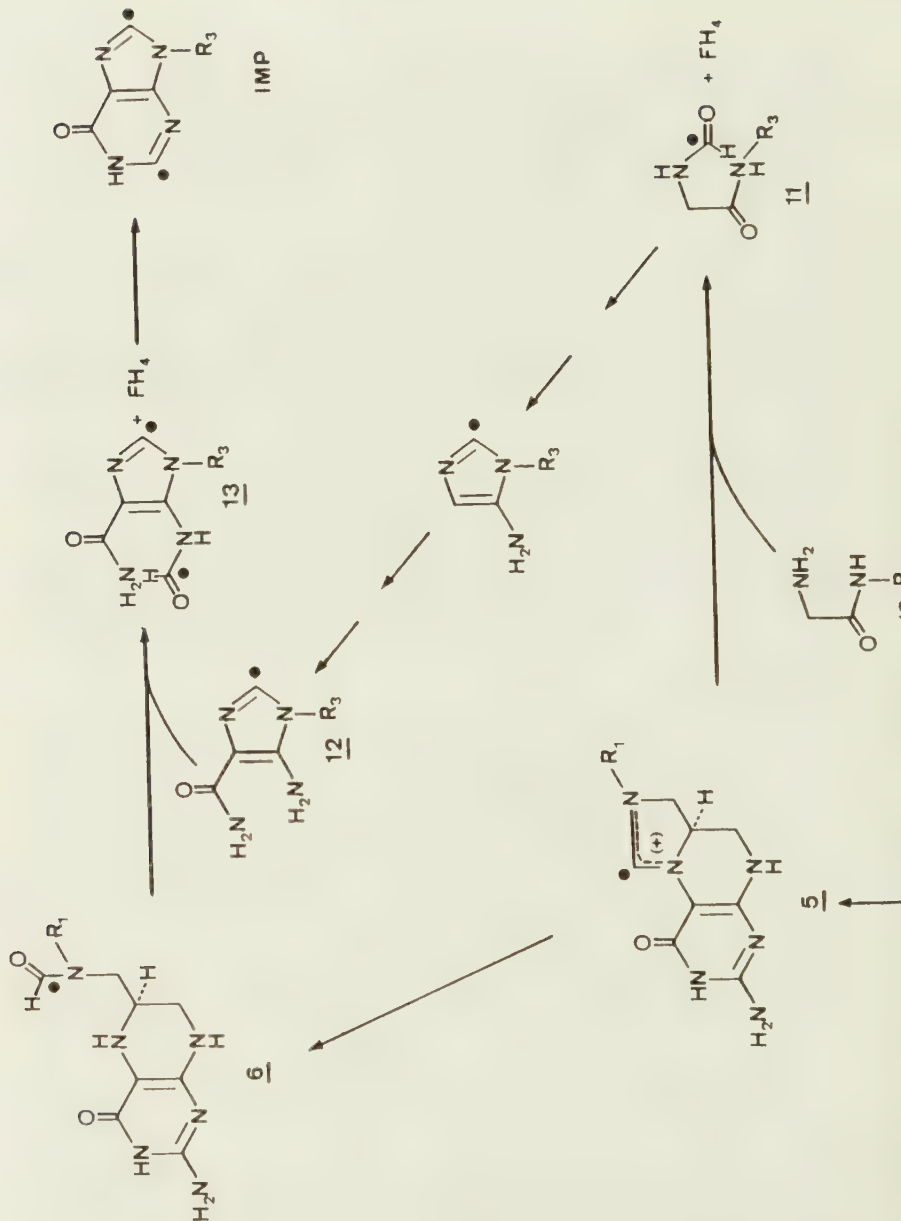
Die Umkehr dieser Reaktion stellt eine andere Möglichkeit für die Beschaffung von C_1 -Gruppen dar. Von dieser Möglichkeit muss dann Gebrauch gemacht werden, wenn der Bedarf an C_1 -Einheiten denjenigen an Glycin in der Proteinsynthese übersteigt, und dadurch Glycin - als Nebenprodukt der C_1 -Produktion aus Serin - angereichert wird. Durch die Verknüpfung der Serin-Transhydroxymethylase Reaktion mit der Glycin-Synthetase Reaktion steht dem Organismus ein Instrumentarium für die unabhängige Regulierung der C_1 - und der Glycin-Produktion zur Verfügung. So können aus einem Molekül Serin die folgenden Einheiten beschafft werden:

- 1 C_1 -Gruppe + 1 Glycin (1x Serin-Transhydroxymethylase Reaktion)
- 2 Glycin (1x Serin-Transhydroxymethylase Reaktion + 1x Glycin-Synthetase Reaktion)
- 2 C_1 -Gruppen (1x Serin-Transhydroxymethylase Reaktion + 1x Glycin-Synthetase Reaktion in der umgekehrten Richtung).

CH_2-FH_4 entsteht auch in einer nicht-enzymatischen Anlagerung von Formaldehyd an FH_4 (siehe Kap. B.1.3.).



Es gibt einige wenige Reaktionen, in denen Formaldehyd als Metabolit erscheint. Sarkosin und Dimethylglycin können z.B. in der Gegenwart von Mitochondrien oxidativ demethyliert werden, wobei Formaldehyd gebildet wird [5]. Man nimmt an, dass auf



diesem Weg ein gewisser Beitrag an den C_1 -Pool geleistet wird [1]. Somit könnten die Methylgruppen von Sarkosin und Dimethylglycin neben C(3) und C(2) von Serin ebenfalls als C_1 -Quelle angesehen werden, ohne zu vergessen, dass diese Methylgruppen von $5-CH_3-FH_4$ stammen und damit ihren Ursprung in Serin selbst haben.

Thymidylat-Synthetase katalysiert die Methylierung von Desoxyuridylat (dUMP) zu Desoxythymidylat (dTMP):



CH_2-FH_4 tritt sowohl als C_1 -Donor, wie auch als Reduktionsmittel auf. Eine ausführliche Besprechung ist in Kap. 2.6. gegeben.

b) $5-CH_3-FH_4$

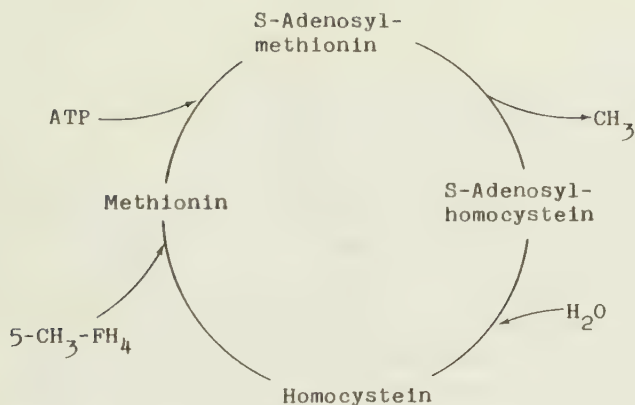
Methyltransferase, ein Vitamin B_{12} abhängiges Enzym, katalysiert die Uebertragung der Methylgruppe von $5-CH_3-FH_4$ auf Homocystein (9).



Neben seiner Bedeutung als proteinogene Aminosäure hat Methionin die Funktion des Methyl donors in etwa 40 Methylierungsreaktionen. Die Methylgruppe von Methionin wird vor der Uebertragung in die energiereiche Methylsulfoniumgruppe des S-Adenosylmethionins umgewandelt.



Nach erfolgter Methyl-Uebertragung wird das entstandene S-Adenosylhomocystein in Adenosin und Homocystein gespalten, wonach letzteres in einen neuen Cyclus eintreten kann (Schema 3).



Schema 3

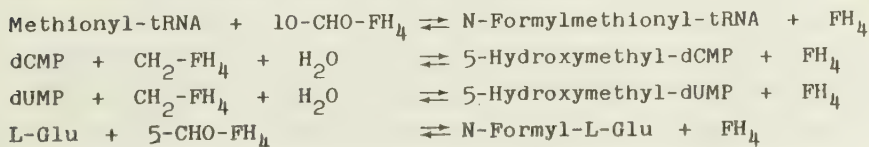
Ausser 5-CH₃-FH₄ können noch ein paar andere Metaboliten eine Methylgruppe auf Homocystein übertragen, wie z.B. Betain. Diese Metaboliten gehen jedoch aus Verbindungen hervor, die ihrerseits in einer an S-Adenosylmethionin gebundenen Methylierungsreaktion entstanden sind. Daher stammen alle Methylgruppen direkt oder indirekt immer von 5-CH₃-FH₄.

c) CH⁺-FH₄ und 10-CHO-FH₄

Bei zwei Stufen in der Purinsynthese werden Kohlenstoffatome mit der Oxidationszahl der Ameisensäure übertragen.

10 wird durch CH⁺-FH₄ zu 11 formyliert, und 10-CHO-FH₄ wandelt 12 in 13 um, welches zu Inosinat, dem Puringrundkörper cyclisiert.

Vier C₁-Übertragungen mit FH₄-Derivaten sind nicht in Schema 2 enthalten. Es sind dies:



Die drei ersten Reaktionen kommen nur in Mikroorganismen vor, und die vierte ist von geringer Bedeutung.

2.4. C₁-Uebertragungen im Katabolismus

Lediglich zwei Metaboliten Übertragen im Verlauf ihres Abbaus ein C-Atom auf FH₄ (Schema 4).

Die Fermentierung von Purinbasen in einigen Bakterien führt zu Formiminoglycin (FIG). Die Formiminogruppe von FIG wird auf FH₄ übertragen, wobei 5-CH=NH-FH₄ entsteht.

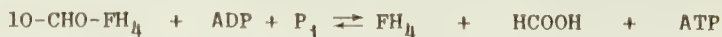
Der Abbau von L-Histidin (His) zu Formiminoglutaminsäure (FIGLU) erfolgt in Bakterien und Wirbeltieren. Auch hier entsteht 5-CH=NH-FH₄ durch die Uebertragung der Formimino-Gruppe von FIGLU auf FH₄.

5-CH=NH-FH₄ cyclisiert unter Austritt von Ammoniak zu CH⁺-FH₄ (vergl. Schema 1). Für CH⁺-FH₄ stehen zwei Wege offen:

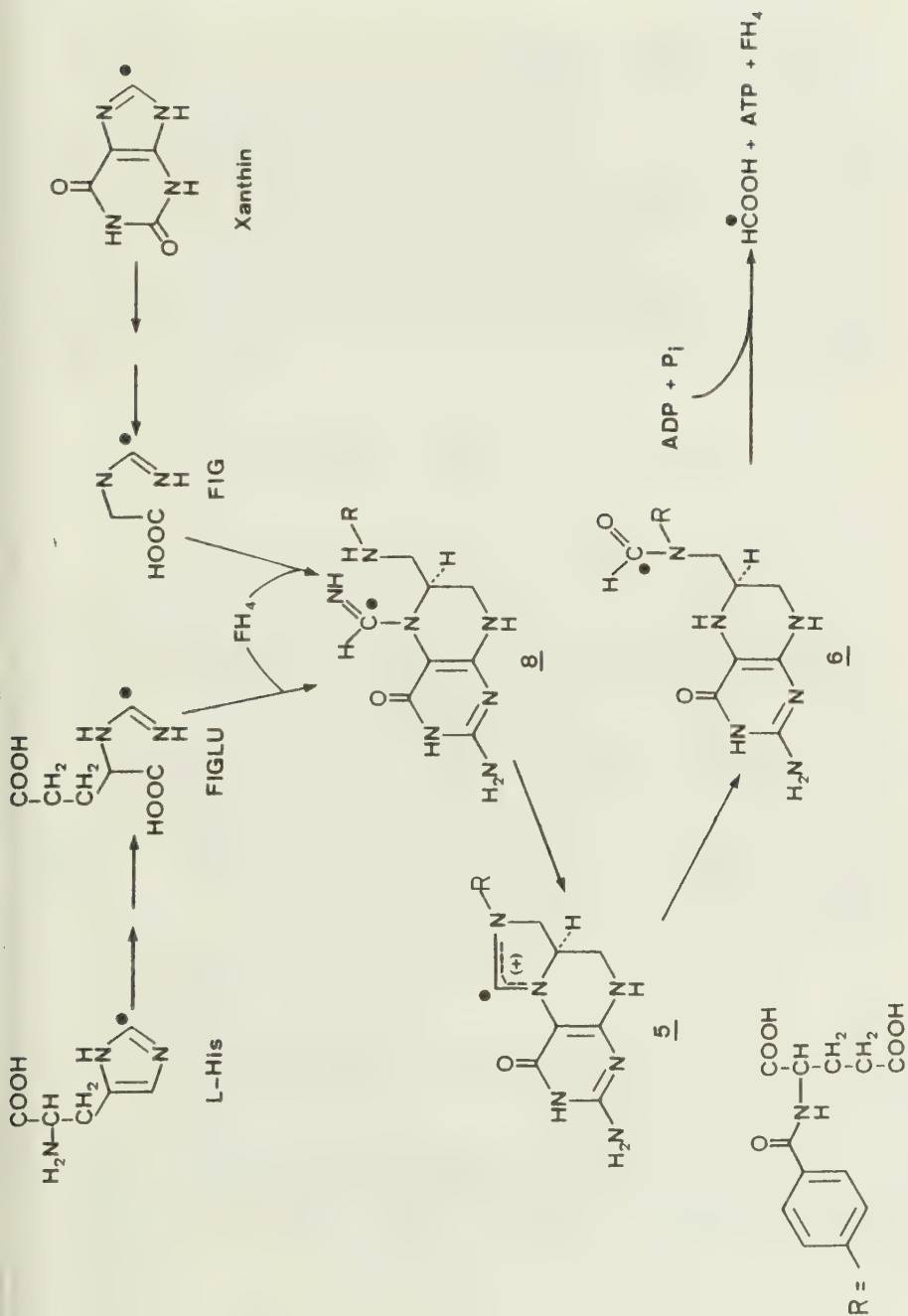
a) Die C₁-Einheit kann für eine der in Kap. 2.3. besprochenen Aufbaureaktionen wieder verwendet werden. Ueber die in Schema 1 dargestellten Reaktionen wird CH⁺-FH₄ in das geforderte C₁-FH₄-Derivat überführt. Dies dürfte in Wirbeltieren der Hauptweg des aus Histidin gewonnenen C₁-Atoms sein.

Die Biosynthese von Histidin verläuft über ATP, für dessen Aufbau zweimal ein C₁-FH₄-Derivat benötigt wird. Daher kann für Organismen, die Histidin synthetisieren (Bakterien) dieses nicht als C₁-Quelle betrachtet werden. Für Wirbeltiere aber, für die Histidin essentiell ist, stellt diese Aminosäure eine C₁-Quelle dar, wenn auch in quantitativ geringem Ausmass.

b) Der andere Weg für CH⁺-FH₄ führt über 10-CHO-FH₄ zu FH₄ und Ameisensäure. Letztere Reaktion wird von 10-Formyl-tetrahydrofolsäure-Synthetase katalysiert.



In der Umkehrung dieser Reaktion kann Ameisensäure als C₁-Quelle in Erscheinung treten. In zahlreichen Inkorporationsexperimenten



Scheme 4

wurde gezeigt, dass Ameisensäure in die in Schema 2 dargestellten Verbindungen eingebaut werden kann [1].

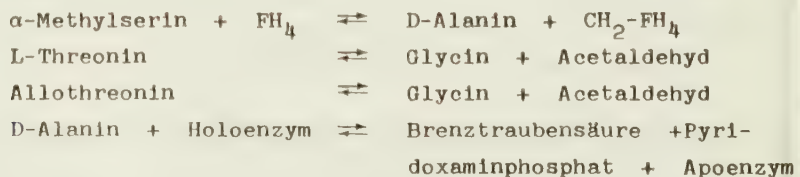
Die oxidative Demethylierung von Sarkosin, Dimethylglycin und anderen Trägern von labilen Methylgruppen in Mitochondrien ergibt neben Formaldehyd auch Ameisensäure [6], die so als Substrat für die 10-Formyltetrahydrofolsäure-Synthetase in Frage kommt. In bezug auf Ameisensäure als mögliche C_1 -Quelle gilt aber der gleiche Einwand, der auf S.24 für Formaldehyd erwähnt wurde.

2.5. Der Mechanismus der Glycin/L-Serin-Umwandlung

Die Serin-Transhydroxymethylase katalysiert die reversible Umwandlung von Glycin in Serin, unter gleichzeitiger Ueberführung von CH_2-FH_4 in FH_4 (siehe S.20).

Das Enzym benötigt Pyridoxylphosphat (14) als Cofaktor. Das Holoenzym aus Rattenleber zum Beispiel enthält 6 Moleküle Pyridoxalphosphat, deren 4 kovalent gebunden sind [7].

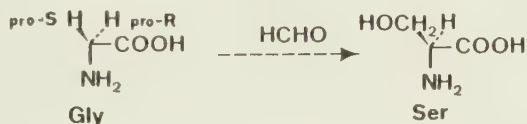
Serin-Transhydroxymethylase katalysiert ebenfalls die folgenden Reaktionen:



Aus Analogie mit anderen Pyridoxalphosphat abhängigen Reaktionen und durch beträchtliche spektrophotometrische Evidenz wurde postuliert, dass der erste Schritt in den genannten Reaktionen

die Bildung des entsprechenden Aminosäure-Pyridoxalphosphat-Imins ist. Für die Glycin/Serin-Umwandlung ist dies 15 in Schema 5.

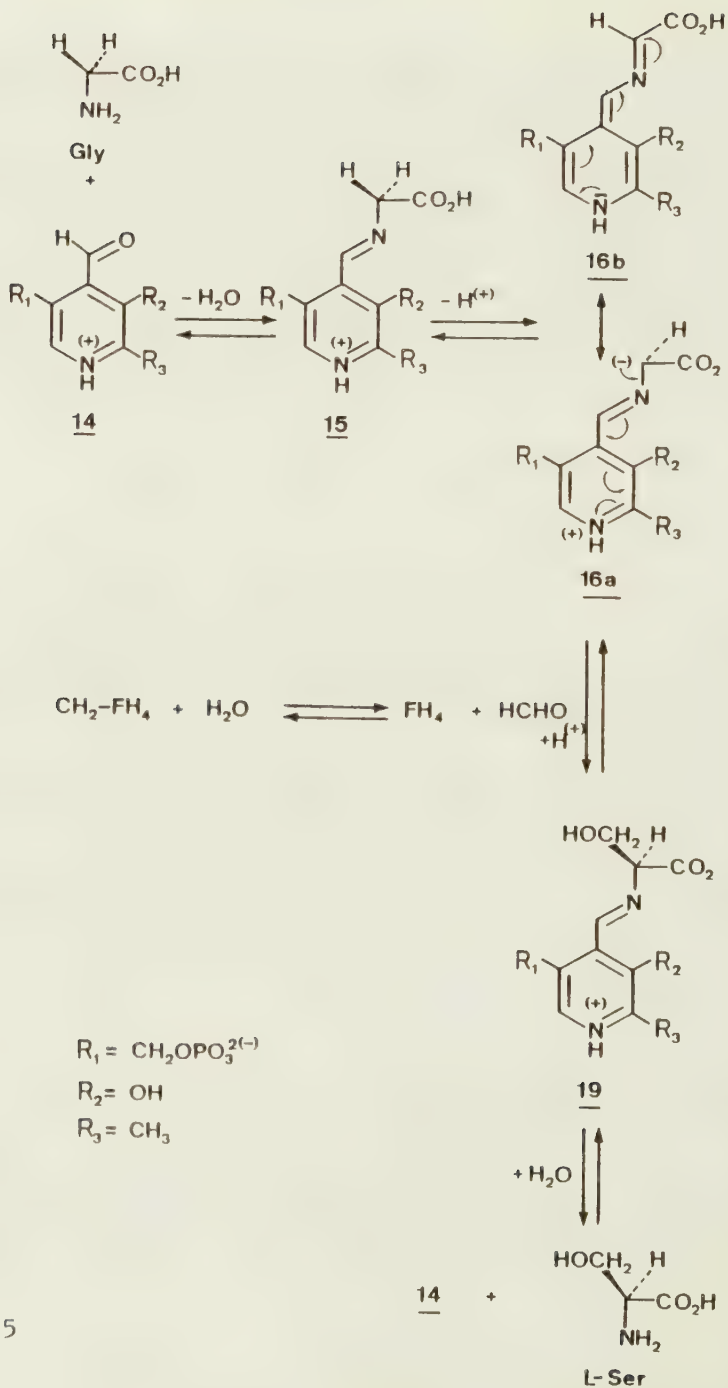
In Abwesenheit von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ katalysiert Serin-Transhydroxymethylase auch den Austausch zwischen einem $\alpha\text{-H}$ -Atom von Glycin und dem Lösungsmittel. Untersuchungen mit stereospezifisch tritiiertem Glycin ergaben, dass ausschliesslich das Pro-S- $\alpha\text{-H}$ -Atom durch Protonen des Lösungsmittels ausgetauscht, bzw. durch eine Hydroxymethylgruppe ersetzt wird [8]. Das Pro-R- $\alpha\text{-H}$ -Atom von Glycin wird zum $\alpha\text{-H}$ -Atom von Serin.



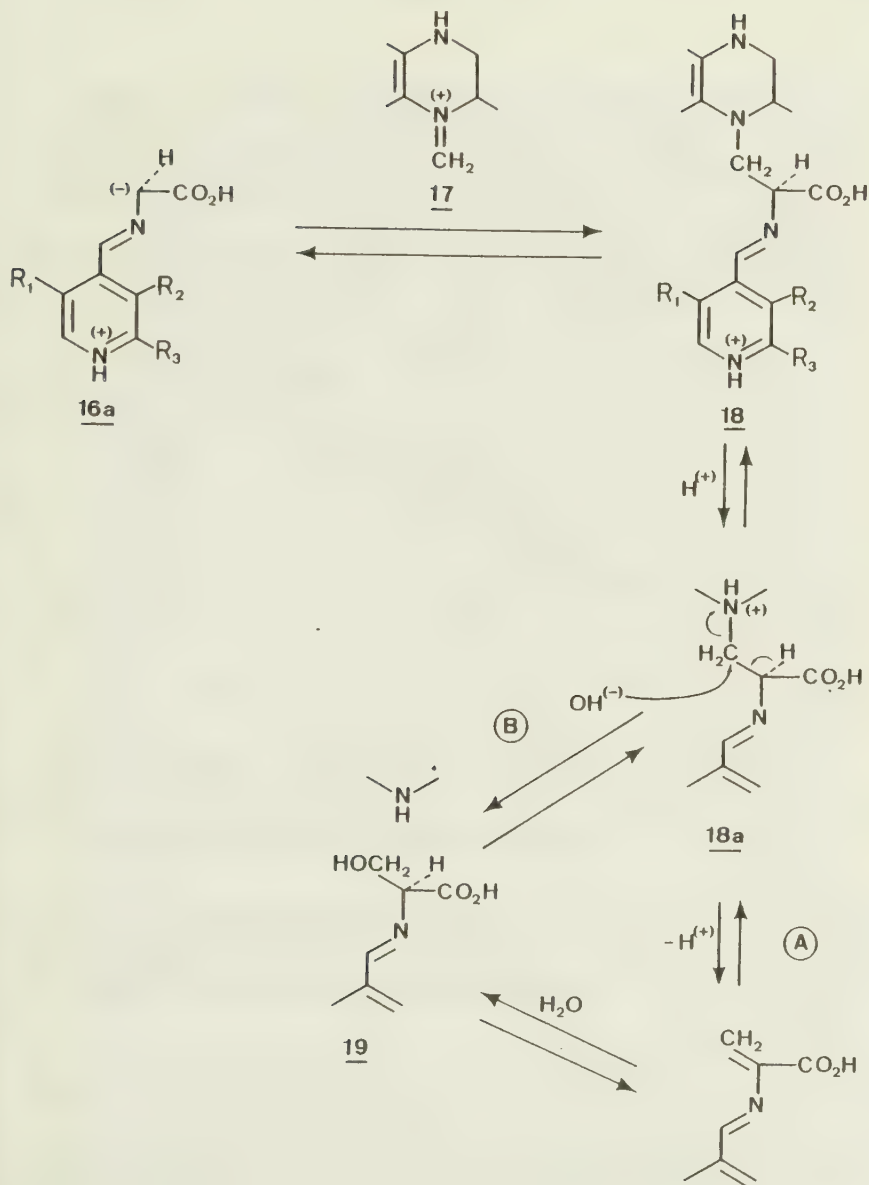
Dies bedeutet, dass in der Gesamtreaktion Glycin $\rightarrow$ Serin die Spaltung einer C-H-Bindung von Glycin und die Bildung einer neuen C-C-Bindung von Serin mit Erhaltung der Konfiguration von (stereospezifisch tritiiertem) Glycin erfolgt.

Diese Feststellung wird dahingehend interpretiert, dass das erste Ereignis in der Weiterreaktion des intermediären Imins 15 die Spaltung einer C-H-Bindung in Glycin ist, was zum Resonanz stabilisierten Carbanion 16 führt [8]. In der Gegenwart von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ kann 16 eine neue C-C-Bindung ausbilden, während in der Abwesenheit von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ das Carbanion wieder protoniert wird, was zum Austausch des einen H-Atoms von Glycin mit den Protonen des Lösungsmittels führt.

Im weiteren Verlauf der Reaktion muss das Carbanion 16a das Übertragbare Kohlenstoffatom von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ angreifen. Die N(5)-N(10)-Methylengruppe selbst ist dafür zu wenig reaktiv, weshalb zwei Möglichkeiten für eine Erhöhung der Reaktivität des Übertragbaren C-Atoms in $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ erwogen wurden.



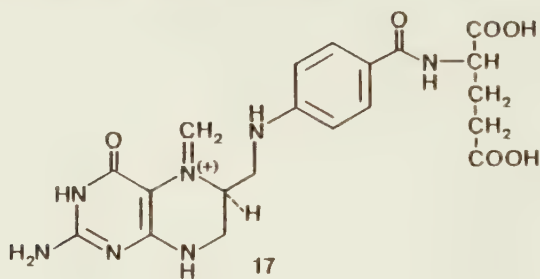
Schema 5



Schema 6

a) $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ dissoziiert nicht-enzymatisch in Formaldehyd und FH_4 . Formaldehyd kann vom Carbanion 16a addiert werden, was nach der Protonierung sofort zum Serin-Pyridoxalphosphat-Imin (19) führt (Schema 5).

b) Es gibt kinetische Hinweise, wonach $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ mit 5-Methylenimmonium- FH_4 (17) im Gleichgewicht steht (siehe Schema 12, S. 50).



17 ist eine reaktive Verbindung, die mit 16a eine Additionsreaktion eingehen kann, wobei 18 entsteht.

Die weitere Umsetzung zum Serin-Pyridoxalphosphat-Imin (19) folgt entweder einer üblichen Eliminations-Additions Reaktion (Mechanismus A), oder einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion (Mechanismus B) (Schema 6).

Der Mechanismus A ist nicht vereinbar erstens mit dem Austausch von nur einem Wasserstoffatom mit dem Lösungsmittel und zweitens mit der Umwandlung von D-Alanin in α -Methyl-L-Serin.

Der Mechanismus B steht zwar in Übereinstimmung mit den erwähnten Daten, doch verlangt er die Spaltung der C-N-Bindung in 18a durch den nukleophilen Angriff von OH^- . Derartige $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktionen treten wegen dem geringen Abgangsgruppenpotential von Aminen normalerweise nur unter drastischen Bedingungen auf. Die Umkehrung der Reaktion mit H_2O als Abgangsgruppe ist noch weniger denkbar.

Die genannten Einwände sprechen also für den Weg, in dem freier Formaldehyd als Substrat teilnimmt. FH_4 wirkt dabei als Formaldehyd-Träger, der dazu dient, Formaldehyd an der aktiven Stelle des Enzyms freizusetzen, wo er direkt mit dem Carbanion 16a reagiert. In der umgekehrten Reaktion kann FH_4 für den Abtransport und die Bindung des toxischen Formaldehyds von der aktiven Stelle erforderlich sein. Der Weg mit Formaldehyd als Zwischenprodukt wird gestützt durch die Beobachtung, dass Serin-Transhydroxymethylase die Umwandlung von Glycin und Acetaldehyd in Threonin oder Allo-threonin ohne die Erfordernis von FH_4 katalysiert. Das Carbanion 16a muss also die Carbonylgruppe von Acetaldehyd direkt angreifen. Da die Carbonylgruppe von Formaldehyd reaktiver als diejenige von Acetaldehyd ist, erscheint der Angriff des Carbanions 16a an den Formaldehyd energetisch günstig, und es ist daher nicht notwendig, dass FH_4 den Formaldehyd aktiviert.

2.6. Der Mechanismus der Thymidylat Synthese

Thymidylat-Synthetase katalysiert die reduktive Methylierung von 2'-Desoxyuridylat (dUMP) zu 2'-Desoxythymidylat (dTMP) mit der gleichzeitigen Ueberführung von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ in FH_2 .



Dieses Enzym ist insofern einmalig, als in der von ihm katalysierten Reaktion $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ die Doppelfunktion des C_1 -Trägers und des Reduktionsmittels ausübt. Letzteres wurde verifiziert, indem man zeigte, dass Tritium von $\text{CH}_2\text{-}[\text{}^3\text{H}(6)]\text{-FH}_4$ in die Methylgruppe von dTMP eingebaut wird [9].

Die Regeneration von FH_4 mittels der durch Dihydrofolsäure-Reduktase katalysierten Reduktion von FH_2 ist für die fortgesetzte Synthese von dTMP erforderlich.

Der Mechanismus für die Thymidylat-Synthetase muss mindestens zwei Schritte beinhalten. Friedkin schlug vor [10], dass zuerst $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ mit dUMP zu einem 5-Thymidyl- FH_4 Zwischenprodukt (20) kondensiert, welches in der Folge über einen 1,3-Hydridshift disproportioniert, um dTMP und FH_2 zu geben (Schema 7). Der erste Schritt stellt eine elektrophile Substitution an C(5) von dUMP durch die Methylengruppe von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ dar, während der zweite Schritt eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion ist, in der das Hydrid, welches von C(6) des Cofaktors stammt, an der zukünftigen Methylgruppe von dTMP angreift und das Amin herauswirft.

Die beiden Reaktionen in Schema 7 sind von der chemischen Erfahrung her schwerlich als Ein-Schritt-Prozesse zu verstehen. Die geringe Acidität des α -Protons von vinylischen Carbonsäuren [11] macht C(5) von dUMP gegenüber einer elektrophilen Substitution wenig reaktiv. Bei der Formulierung des zweiten Schritts stösst man auf Schwierigkeiten, weil >N^- als Abgangsgruppe wohl kaum in Frage kommen kann.

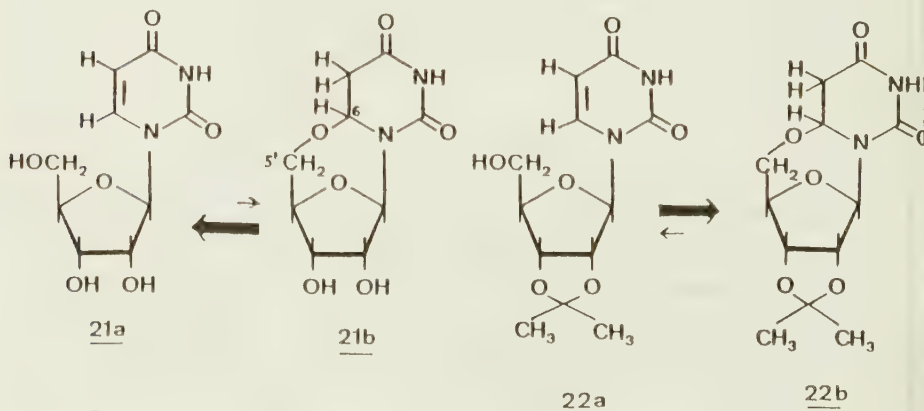
Um den detaillierten Mechanismus der Reaktion der Thymidylat-Synthetase abzuklären sind zahlreiche Untersuchungen an Modellverbindungen durchgeführt worden [12], wovon hier einige besprochen werden sollen.

Ein wichtiger Befund in bezug auf den vorgeschlagenen Mechanismus der Thymidylat-Synthetase ist die Beobachtung, dass in Gegenwart von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ das Enzym auch den Austausch des Wasserstoffs an C(5) von dUMP mit den Protonen des Lösungsmittels katalysiert. Diese Reaktion stellt auch eine elektrophile Substitution dar und ist wahrscheinlich mechanistisch mit dem ersten Schritt der Synthese von dTMP verwandt.

In nicht-enzymatischen Versuchen mit N(1)-substituierten Uracilen stellte man fest, dass ebenfalls in Stellung 5 elektrophile Substitutionen erfolgen können. So führt die Reaktion mit Formaldehyd zu 5-Hydroxymethyluracilen [13], und tritierte Uridine verlieren bei Erwärmen mit starken Säuren oder Basen ^3H an C(5) und nicht an C(6)[14].

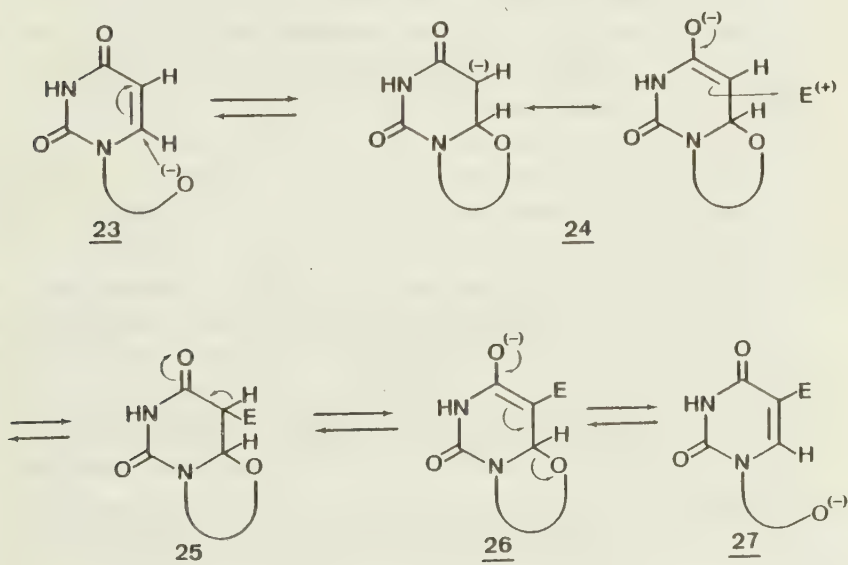
Man untersuchte die Geschwindigkeit der elektrophilen Substitution an C(5) (H-Austausch oder Hydroxymethylierung) in Abhängigkeit des Substituenten an N(1), um Hinweise über den Mechanismus zu erhalten.

Der H-Austausch bei Uracilen, die an N(1) mit Zuckern oder ω -Hydroxyalkanen substituiert sind, erfolgt ca. 10^3 mal schneller als bei solchen, deren N(1)-Substituent keine Hydroxylgruppe trägt [15]. Die Geschwindigkeitserhöhung des H(5)-Austausch bei Ribose-substituierten Uracilen verlangt die Anwesenheit der 5'-OH-Gruppe. Ferner stellte man eine 67 fache Geschwindigkeitserhöhung des H-Austausches beim 2',3'-Acetonid 22 in bezug auf das Uracil mit freien Hydroxylgruppen im Riboserest 21 fest [16]. Es ist bekannt, dass das 2',3'-Acetonid die 6,5'-cyclische Form 22b des Nukleosids erzwingt [17](Schema 8).



Schema 8

Die gleichen strukturellen Merkmale, das heisst Begünstigung der 6,5'-Cyclisierung sind für die Leichtigkeit der Hydroxymethylierung an C(5) durch Formaldehyd verantwortlich [18]. Auf der Basis dieser Beobachtungen wurde ein allgemeiner Mechanismus für die elektrophile Substitution an C(5) vorgeschlagen, welcher die intramolekulare Katalyse durch den nucleophilen Angriff des N(1)-Substituenten beinhaltet (Schema 9). Der Angriff des Oxyanions in 23 an C(6) führt zum Resonanz stabilisierten Enolatanion 24, welches das Elektrophil E^+ addiert. Die Protonenabspaltung aus 25 ergibt das Enolatanion 26, welches den 6-Substituenten eliminiert, um das substituierte Produkt 27 zu geben.

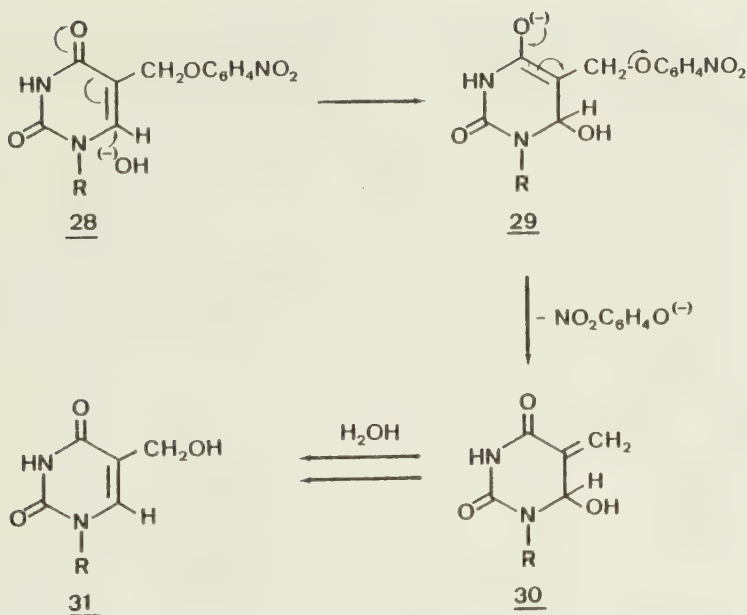


Schema 9

Im Hinblick auf das schlechte Abgangsgruppenpotential von Aminen war es fragwürdig, für den zweiten Schritt einen Mechanismus in Betracht zu ziehen, bei dem an der N-Methylen-Gruppe von Thymidyl-FH₄ eine S_N2-Reaktion mit Hydrid als Nukleophil auftritt. Dennoch war bekannt, dass Uridine mit einer Gruppierung CH₂-X an der Stellung 5 leicht eine nukleophile Substitution eingehen können: so alkyliert z.B. 5-Hydroxymethyluracil schwach nucleophile aromatische Amine in wässriger Base sofort [19]. Es wurde deshalb der Mechanismus der nukleophilen Substitution an Modellverbindungen untersucht, die an der Stelle 5 die Gruppierung CH₂OC₆H₄-p-NO₂ besitzen [20]. Obwohl die Abgangsgruppe im Modellsystem sich von FH₄ stark unterscheidet, wurde erwartet, dass die wesentlichen Züge der Reaktion vom Heterocyclus bestimmt werden und diese unabhängig von der Natur der Abgangsgruppe erhalten bleiben. Die basenkatalysierte Hydrolyse von N(1)-substituierten 5-p-Nitrophenoxymethyluracilen 28 (Schema 10) führt über die Addition des Hydroxylanions an C(6) zur Ausbildung eines Resonanz stabilisierten Enolatanions 29. Dieses Zwischenprodukt eliminiert p-Nitrophenoxid, um 30 mit einer exocyclischen Doppelbindung zu geben, an welche sofort Wasser addiert wird. Dieser Mechanismus wurde gestützt durch die Beobachtung von Isotopie-Effekten: Bei Verwendung von in der Methylengruppe deuterierten Reaktanden konnte man einen sekundären Isotopie-Effekt ($k_H/k_D = 1,28$) feststellen, was ein Hinweis für die Rehybridisierung der Methylengruppe von sp³ zu sp² ist. Mit an C(6) deuterierten Derivaten hat man einen inversen sekundären Isotopie-Effekt ($k_H/k_D = 0,89$) gemessen, was auf eine Rehybridisierung von sp² zu sp³ an C(6) deutet. [20].

Diese Resultate lassen sich folgendermassen zusammenfassen.

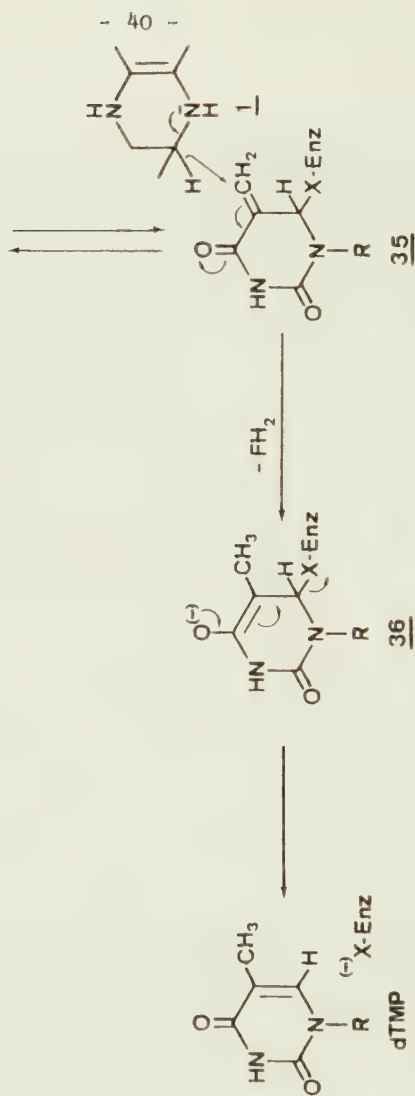
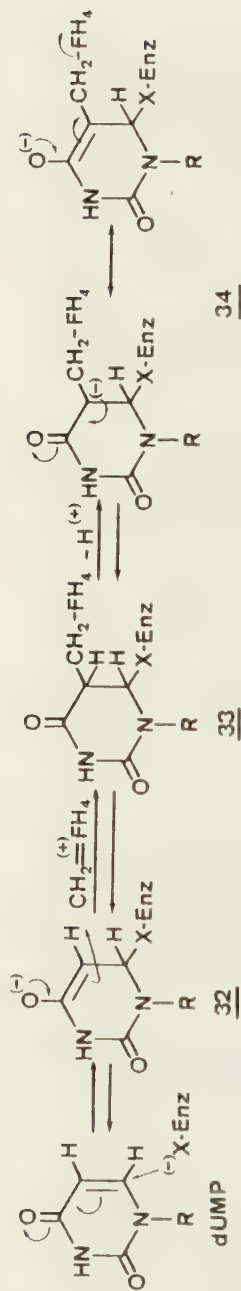
1) Nukleophile Substitutionen mit Modellen von Thymidyl-FH₄ verlaufen ausschliesslich über den S_N2-Typ mit einem Zwischenprodukt, in dem die Methylengruppe sp²-hybridisiert ist.



Schema 10

2) Die treibende Kraft für die Bildung von solchen Zwischenprodukten kann durch den nukleophilen Angriff an C(6) verschafft werden, was zur Ausbildung eines reaktiven Enolatanions führt, das sofort zum exocyclischen Methylen-Derivat unter Eliminierung der Abgangsgruppe umgewandelt wird.

Die kombinierten Studien erlauben die Konstruktion eines chemisch vernünftigen Mechanismus für die Thymidylat-Synthetase, der in Schema 11 dargestellt ist.



R = 2'-Desoxy-5'-Phosphoribose

Die Reaktion wird durch den Angriff einer nukleophilen Gruppe des Enzyms ($\bar{X}$ -Enz) an die Stelle 6 von dUMP eingeleitet, um ein Enolat-Zwischenprodukt 32 mit hoher Elektronendichte am C-Atom 5 zu ergeben. Das aktivierte Zwischenprodukt reagiert mit der Methylimmoniumgruppe des Cofaktors 17 zum Thymidyl-FH₄ Zwischenprodukt 33. Die Abstraktion des Protons an C(5) ergibt das Enolat 34, das durch eine β -Elimination in 35 mit einer exocyclischen Doppelbindung umgewandelt wird. Intermolekularer Hydrid-Transfer von FH₄ auf 35 führt zum Enolat 36, das nach β -Elimination zu dTMP wird.

B. Die Bestätigung der Struktur von 5,10-Methylen-(6R,8)-
5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure

1. Die Entdeckung von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$

1.1. Uebersicht

1954 wurde entdeckt, dass bei der enzymatischen Umwandlung von Glycin in L-Serin in der Leber eine reaktive Verbindung zwischen FH_4 und Formaldehyd als Cofaktor benötigt wird. Für diese Verbindung wurde der Begriff "aktiver Formaldehyd" eingeführt und als Struktur die 5,10-Methylen-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure ($\text{CH}_2\text{-FH}_4$) vorgeschlagen, obwohl 5-Hydroxymethyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure ($5\text{-CH}_2\text{OH-FH}_4$) auch als eine mögliche Struktur angesehen werden kann [21].

Bis heute konnten laut [22] und [23] 4 Hinweise für eine Methylenbrückenstruktur im aktiven Formaldehyd gefunden werden:

- a) Die Grösse der Gleichgewichtskonstanten des Zerfalls von aktivem Formaldehyd in Formaldehyd und FH_4
- b) Die chemische Reduzierbarkeit von $\text{CH}^+\text{-FH}_4$ zu aktivem Formaldehyd
- c) Die Existenz eines 2-Stufen Mechanismus bei der Reaktion von FH_4 mit Formaldehyd
- d) ^1H -NMR.-Daten der Methylenprotonen

Im folgenden Teil dieser Arbeit werden die Befunde, die die Methylenbrückenstruktur stützen, in chronologischer Reihenfolge ausführlich dargestellt. In der anschliessenden Diskussion (Kap. 1.7.) werden die Mängel dieser Daten im Hinblick auf eine eindeutige Bestätigung der Struktur von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ aufgezeigt. Im zweiten Teil werden dann die eigenen Resultate, die eine eindeutige Bestätigung der genannten Struktur ergaben, beschrieben.

1.2. Aktiver Formaldehyd als Cofaktor bei der Umwandlung von Glycin in L-Serin

Mit Hilfe von isotopenmarkiertem Glycin oder L-Serin konnte die Umwandlung dieser beiden Aminosäuren ineinander in Leberpräparaten und im lebenden Tier nachgewiesen werden [24,25,26]. Inkorporationsversuche mit an Folsäuremangel leidenden Tieren oder gereinigten Leberpräparaten ergaben, dass bei der Umwandlung von Glycin in Serin ein Folsäure-Derivat katalytisch teilnimmt [27,28,29]. In gereinigten Taubenleberextrakten, die mit Folsäure angereichert wurden, konnte bei der Umwandlung von Serin in Glycin das Entstehen von Formaldehyd nachgewiesen werden. Umgekehrt wurde im gleichen System Glycin mit ^{14}C -Formaldehyd zu Serin umgesetzt, wobei die Radioaktivität in Serin am Kohlenstoffatom 3 zu finden war. Ebenfalls im gleichen System wurde die Bildung von radioaktivem Serin aus markiertem Glycin und unmarkiertem Serin beobachtet [21].

Zur Abklärung der Frage, welches Folsäure-Derivat dem aktiven Coenzym strukturmässig am nächsten kommt, wurden Folsäure, 5-CHO-FH₄ und FH₄ hinsichtlich ihrer katalytischen Wirksamkeit untersucht.

FH₄ erwies sich gegenüber Folsäure und diese gegenüber 5-CHO-FH₄ bei der Aminosäureumwandlung als katalytisch aktiver. Bei Verwendung von Folsäure als Katalysator wurde ein reduzierendes Medium, bestehend aus NADH und ATP benötigt. FH₄ hingegen war auch ohne diese Zusätze aktiv.

Folsäure wurde erst nach einer gewissen Verzögerungszeit (initial lag) im oben genannten Medium aktiv, FH₄ wirkte sofort. Der Zusatz von 4-Aminofolsäure, ein Inhibitor der Dihydrofolsäure-Reduktase, inaktivierte die Folsäure, nicht aber FH₄.

Diese Resultate bedeuten, dass Folsäure erst nach ihrer Reduktion zu FH₄ katalytisch wirksam wurde.

Die Befunde, dass 1. Formaldehyd als Metabolit bei der Glycin-Serin-Umwandlung auftritt und 2. FH_4 dabei eine Coenzym-Funktion ausübt, veranlasste Blakley zu folgenden Ueberlegungen [21]:

"Die reaktive Natur des Formaldehyds und sein Inhibitor-Effekt auf einige Enzym-Systeme machen ihn als normales Enzymsubstrat unwahrscheinlich. Andernseits bilden Leberschnitte Formaldehyd aus C(3) von Serin, so dass er entweder ein normales Zwischenprodukt des Metabolismus ist, oder nahe verwandt mit einem. Es scheint wahrscheinlich, dass der aktive Formaldehyd, welcher der unmittelbare Vorläufer von C(3) von Serin ist, sowohl aus labilen Methylgruppen von Sarcosin, Methionin, Cholin und Betain, als auch aus Formaldehyd gebildet werden kann und in vitro in freien Formaldehyd zerfällt, letzterer aber kein normaler Metabolit in vivo darstellt."

"Der aktivierende Effekt von FH_4 beruht vermutlich auf der enzymatischen Kombination von FH_4 mit Formaldehyd zu einem aktiven Zwischenprodukt. Eine mögliche Struktur ist 5,10-Methylen-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure. Andernseits könnte die 5-Hydroxymethyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure auch in Betracht gezogen werden, obwohl die grössere Instabilität dagegen sprechen würde."

1.3. Die chemische Synthese von aktivem Formaldehyd:

Dissoziationskonstante

Die chemische Synthese von aktivem Formaldehyd durch blosses Mischen von Formaldehyd und FH_4 wurde in [30] und [31] erstmals beschrieben.

Zunächst wurde untersucht, wieviele Moläquivalente Formaldehyd von FH_4 und anderen Pterinen angelagert werden können.

Blaklëy inkubierte verschiedene Pterine und Folsäure-Derivate mit ^{14}C -markiertem Formaldehyd im Ueberschuss und fällte die Bariumsalze der Addukte mit Alkohol. Aus den gemessenen Aktivitäten wurden die molaren Verhältnisse von Formaldehyd und Pterin bzw. Folsäure-Derivat in den Addukten bestimmt [32]. FH_4 , FH_2 , 6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin und 10-CHO- FH_4 addierten je ein Äquivalent Formaldehyd, während bei 5-CHO- FH_4 keine Addition erfolgte. Dieses Ergebnis nahm man als Hinweis dafür, dass für die Bindung von Formaldehyd nur das Stickstoffatom 5 benötigt wird.

Im weiteren wurde die Reversibilität der Additionsreaktion gezeigt. Löste man das mit ^{14}C -markiertem Formaldehyd und FH_4 hergestellte Addukt in unmarkierter Formaldehyd Lösung, so erfolgte eine Verteilung der Radioaktivität.

Auf andere Resultate kam Kisliuk [33]. Er gab Formaldehyd mit Pterinen und Folsäure-Derivaten in äquimolaren Mengen zusammen, adsorbierte die Produkte an einer Anionenaustauschersäule und bestimmte die freie Formaldehyd-Konzentration. In der folgenden Aufstellung ist die Menge Formaldehyd, die zurückbestimmt wurde, in Prozenten des anfangs zugegebenen, angegeben.

FH_4 : 15%; 10- CH_3 - FH_4 : 93%; 6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin: 95%; 5-CHO- FH_4 : 98%; Folsäure: 99%; FH_2 : 94%.

Daraus wurde gefolgert, dass sowohl N(5), als auch N(10) frei sein müssen, um ein Formaldehyd-Addukt zu erhalten.

Spezifischere Aussagen wurden durch die Messung der Dissoziationskonstanten der Addukte von Formaldehyd mit Pterinen und Folsäure-Derivaten gewonnen.

Zuerst bestimmte man die Dissoziationskonstanten durch Messung der Formaldehyd-Konzentration im Gleichgewicht mit bekannten Pterin- und FH_4 -Konzentrationen [34].

Später wurden sie spektrophotometrisch gemessen [35].

Das UV-Spektrum von FH_4 in einer Konzentration von 0,03mM weist ein Maximum bei 298nm mit einem Extinktionskoeffizienten von 28000 auf. Nach der Zugabe von Formaldehyd in einer Endkonzentration von 10mM wird das Maximum um 4nm nach 294nm verschoben und der Extinktionskoeffizient steigt auf 32000.

Aus dem Ausmass der Veränderung des UV-Spektrums von FH_4 nach der Zugabe von Formaldehyd in verschiedenen Konzentrationen wurde das Verhältnis von FH_4 zu Addukt errechnet.

Die Dissoziationskonstanten von FH_4 , Folsäure-Derivaten und Pterinen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1

Dissoziationskonstanten ($K_{\text{Diss}} = [\text{HCHO}][\text{Base}]/[\text{Addukt}]$) für die Addukte, gebildet aus Formaldehyd und den angegebenen Basen.

		K_{Diss} [34]	K_{Diss} [35]
Gruppe A	FH_4	0,0004	0,0003
Gruppe B	FH_2	0,01	
	10-CHO- FH_4	0,01	0,016
	10-CH ₃ - FH_4	0,03	
	6-Methyl- H_4 -pterin	0,04	
Gruppe C	5-CHO- FH_4	0,41	
	5-Formyl- H_4 -pterin	0,45	

Aus der Tabelle 1 gehen 3 Gruppen (A,B und C) mit jeweils in der gleichen Grössenordnung liegenden Dissoziationskonstanten hervor. Gruppe A besteht nur aus FH_4 mit freien Stickstoffatomen 5 und 10. Die Derivate der Gruppe B haben alle ein freies Stickstoffatom 5 und kein, oder ein tertiäres Stickstoffatom 10. Die Dissoziationskonstanten sind 25 bis 100x grösser als diejenige für den aktiven Formaldehyd. Bei den Vertretern der Gruppe C ist N(5) substituiert und die Konstanten liegen nochmals um den Faktor 10 höher als bei der Gruppe B.

Aus diesen Resultaten wurde geschlossen, dass der extrem tiefe Wert der Dissoziationskonstanten des Addukts von FH_4 mit Formaldehyd durch die Bindung des C_1 -Fragments an $\text{N}(5)$ und $\text{N}(10)$ zustandekommen muss.

Damit war das erste Indiz für die Methylenbrückenstruktur geschaffen.

1.4. Die Synthese von aktivem Formaldehyd durch chemische Reduktion von CH^+-FH_4

Es wurde ein Enzym gefunden, welches das folgende Redoxgleichgewicht zwischen aktivem Formaldehyd und CH^+-FH_4 katalysiert [36][37] (Reaktion B in Schema 1).



Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Ringstruktur von CH^+-FH_4 während der Reduktion zu aktivem Formaldehyd erhalten bleibt, wurde die Umwandlung der beiden Verbindungen ineinander auf chemischem Wege untersucht.

Es ergab sich, dass die Behandlung von CH^+-FH_4 mit Natriumborhydrid zu einem Produkt führte, dessen UV-Spektrum mit demjenigen des aktiven Formaldehyds identisch war. Das Reaktionsprodukt war auch im Serin-Transhydroxymethylase-System aktiv.

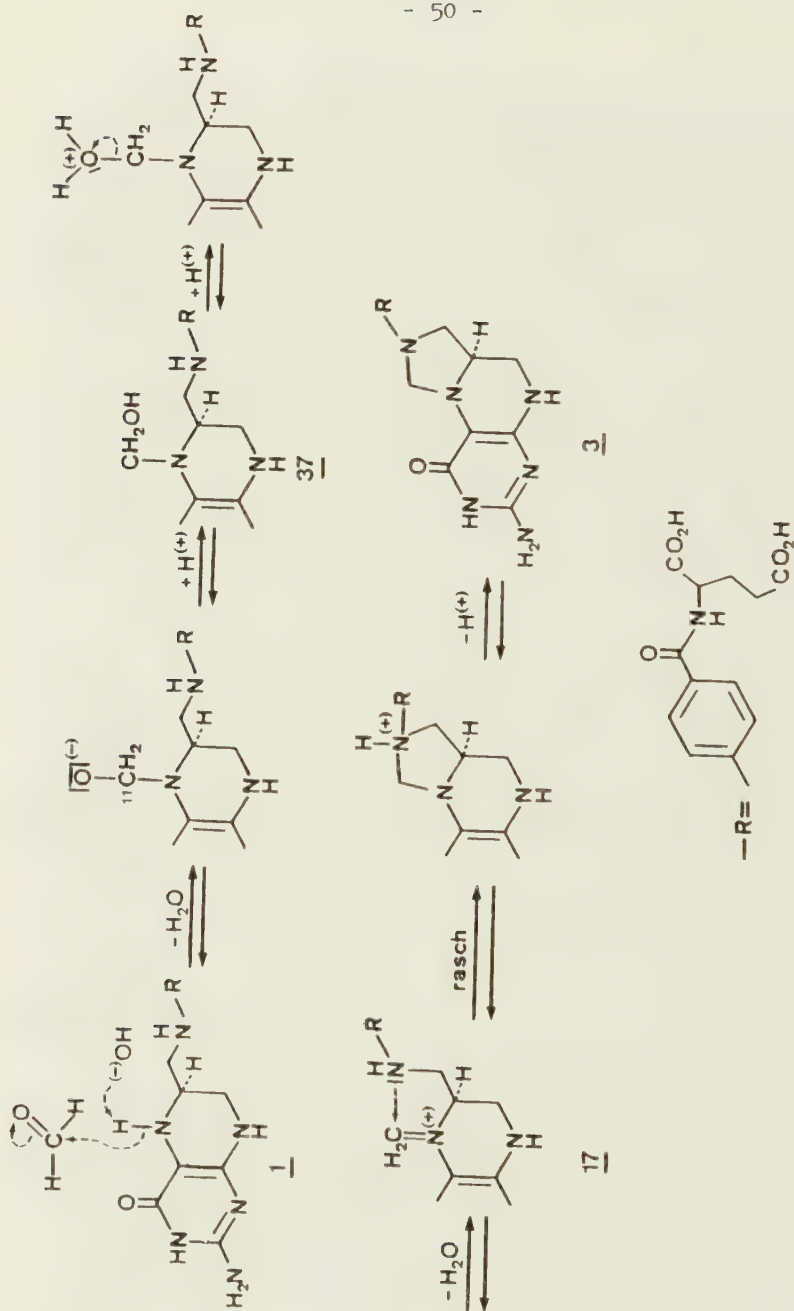
Behandelte man hingegen 5-CHO- FH_4 oder 10-CHO- FH_4 mit Natriumborhydrid, so konnte keine Reaktion festgestellt werden. Es war daher naheliegend, bei der Reduktion von CH^+-FH_4 die Erhaltung der Ringstruktur anzunehmen, um damit einen weiteren Hinweis für die Methylenbrückenstruktur im aktiven Formaldehyd zu haben [22].

1.5. Die Kinetik der Reaktion von Formaldehyd mit FH_4

Einen direkten Hinweis für die Teilnahme von N(5) und N(10) von FH_4 in der chemischen Synthese von aktivem Formaldehyd erhielt man durch die Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des pH. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde spektrophotometrisch durch die Erhöhung der Lichtadsorption bei 294nm nach der Zugabe von Formaldehyd zu einer Lösung von FH_4 beim gewünschten pH bestimmt. Die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Bildung von aktivem Formaldehyd folgt einer glockenförmigen Kurve mit einem pH-Optimum von 5,9 und Wendepunkten bei pH 4,8 und pH 7,1. Diese Kurve wurde zunächst als Hinweis für die Beteiligung von 2 prototropen Gruppen genommen, deren pKs-Werte bei den Wendepunkten liegen sollten [22].

Als später die pKs-Werte von FH_4 bekannt waren [38], musste diese Hypothese verworfen werden, da der Wendepunkt des basischen Schenkels keinem pKs-Wert entsprach. In einer ausführlichen Arbeit von Kallen und Jencks [39] wurde das pH-Reaktionsgeschwindigkeits-Profil in Analogie zu bekannten Reaktionen mit Carbonylverbindungen [40] als bedingt durch einen Wechsel des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts mit wechselndem pH interpretiert (Schema 12).

Der eine Schritt ist der nukleophile Angriff von N(5) von FH_4 (1) an die Carbonylgruppe des Formaldehyds, was nach Umprotonierung zu 5-Hydroxymethyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (37) führt. Diese Verbindung stellt die Alternativstruktur des aktiven Formaldehyds dar und käme ihm dann zu, wenn die Reaktion von Formaldehyd mit FH_4 nach dem ersten Schritt stehenbliebe. Der zweite geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Dehydratisierung des intermediären Carbinolamins 37 zur 5-Methylenimmonium-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (17) Der intramolekulare Angriff von N(10) an das kationische Imin 17 erfolgt rasch und wird nicht geschwindigkeitsbestimmend auftreten.



Die Analogie mit anderen Kondensationen von Carbonylverbindungen mit Aminen legt nahe, dass der Angriff des Amins an Formaldehyd im sauren Milieu geschwindigkeitsbestimmend ist, die Dehydratisierung ist säurekatalysiert.

Die Rate des Angriffs steigt mit steigendem pH in der Gegend, wo das Amin protoniert ist, weil nur die freie Base reagiert. Folgender Umstand erhärtet die Zuordnung der beiden

Schritte: Bei pH 8,5 weist das pH-Geschwindigkeits-Profil der Anlagerung von Formaldehyd an FH_4 einen "initial burst" auf, was auf die schnelle Bildung eines Zwischenprodukts hinweist, das dann in einer langsamen Reaktion weiterreagiert. Wäre der Dehydratationsschritt bei pH 8,5 schnell, so könnte bei diesem pH kein Zwischenprodukt (= initial burst) nachgewiesen werden.

Eine weitere Evidenz für die Bildung eines Zwischenprodukts ist das "leveling off" der Geschwindigkeit bei steigender Formaldehyd-Konzentration bei basischem pH. Wenn FH_4 vollständig in das Zwischenprodukt übergeführt ist, kann eine weitere Erhöhung der Aldehyd-Konzentration nicht in einer Geschwindigkeitserhöhung resultieren, und die Dehydratationsgeschwindigkeit wird direkt beobachtet.

1.6. ^1H -NMR.-Daten

Für die beiden Methylenprotonen an C(11) wurden chemische Verschiebungen von 3,78 und 4,99 ppm, sowie eine geminale Kopplungskonstante von 4 Hz gemessen (Lösungsmittel: d_6 -DMSO/ d_5 -Pyridin = 9:1) [41]. Benkovic [23] nahm diese Daten als eine direkte Bestätigung der Imidazolidinring-Struktur des aktiven Formaldehyds an.

1.7. Diskussion

Die Schwierigkeit einer zuverlässigen Bestimmung der Struktur des aktiven Formaldehyds liegt darin, dass FH_4 mehrere Stellen besitzt, die theoretisch Formaldehyd anlagern können: N(5), N(10), N(8), N(2') und N(3).

Aufgrund der Analogie mit den anderen $\text{C}_1\text{-FH}_4$ -Derivaten, deren Strukturen gesichert sind, kann man annehmen, dass die Stellen N(5) und/oder N(10) die grösste Affinität für Formaldehyd aufweisen. Die Bestimmung der Struktur des aktiven Formaldehyds begrenzt sich damit auf die Aufgabe, zwischen den beiden Alternativen 5-Hydroxymethyl- oder 5,10-Methylen- FH_4 zu unterscheiden.

Die letztere Struktur wird unter anderem gestützt durch das (falsche) Ergebnis [33] (S. 46), dass nur im Pyrazinring hydrierte Pterine der Folsäurereihe mit den freien funktionellen Gruppen N(5) und N(10) mit Formaldehyd reagieren können. Viscontini und Bieri [44] konnten zeigen, dass auch hydrierte Pterine ohne Seitenkette, und damit ohne die funktionelle Gruppe N(10), unter reversibler Anlagerung von Formaldehyd in N(5)-Stellung, Hydroxymethyl-Derivate bilden.

Im weiteren wird die 5,10-Methylenbrückenstruktur aus der Beobachtung abgeleitet, dass FH_4 (mit den freien N(5)- und N(10)-Stellungen) Formaldehyd viel stärker binden kann, als andere Pterine (Tab. 1).

Um zuverlässige Assoziationskonstanten zu bestimmen, muss aber ausgeschlossen werden können, dass bei den verwendeten Ueberschüssen an Formaldehyd gegenüber FH_4 mehr als ein Äquivalent Formaldehyd gebunden wird.

Für die experimentellen Bedingungen, unter denen die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten auf chemischem Weg bestimmt wurden [34] (S. 46), trifft dies jedoch nicht zu. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass FH_4 in einer Konzentration von 0,1 M in Gegenwart von 0,5 M Formaldehyd sofort 3 Moleküle Formaldehyd anlagert (siehe Kap. 3). Im andern Fall sind die Werte mittels UV-Spektroskopie bestimmt worden [35]. Dort verwendet man natürlich sehr tiefe Konzentrationen, und die eben erwähnte Beobachtung der Ueberaddition darf nicht ohne weiteres auf diese Situation übertragen werden. Für eine einfache Addition des Aldehyds, der im Ueberschuss verwendet wird, an FH_4 bei den für die UV-Messungen verwendeten Konzentrationen, spricht die Beobachtung eines isosbestischen Punktes im UV-Spektrum von FH_4 während der Zugabe von Formaldehyd in verschiedenen Konzentrationen [35]. Das Vorhandensein eines isosbestischen Punktes würde bedeuten, dass nur 2 Produkte miteinander im Gleichgewicht stünden, was bei einer Ueberaddition nicht der Fall wäre. Die Änderungen im UV-Spektrum von FH_4 nach der Zugabe von Formaldehyd sind aber derart gering, dass, unter Berücksichtigung des experimentellen Fehlers, ein isosbestischer Punkt wohl nicht mit Bestimmtheit nachgewiesen werden kann.

Für die Messung der Kinetik der Reaktion von FH_4 mit Formaldehyd ergibt sich die gleiche Problematik der Ueberaddition.

Untersuchungen, die unter Bedingungen gemacht wurden, wo die Möglichkeit der Addition von mehr als einem Molekül Formaldehyd an FH_4 theoretisch besteht, verlieren aber an Bedeutung für die Strukturbestimmung.

Der Vergleich des Wertes der geminalen Kopplungskonstanten der Methylenprotonen von 4 Hz mit den NMR.-Daten von Modellverbindungen für den aktiven Formaldehyd, die nachgewiesenermaßen die Imidazolidinringstruktur besitzen (Tetrahydrochinoxalin-Derivate, die mit Formaldehyd umgesetzt wurden [42]), ergibt eine gute Übereinstimmung.

Bei einer Methylengruppe, die an ein Stickstoff- und ein Sauerstoffatom gebunden ist (was bei der Alternativstruktur 37 der Fall ist) könnten die Protonen eine ähnliche geminale Kopplungskonstante aufweisen [43]. Da diese Protonen in 37 diastereotop sind, könnte die geminale Kopplung ebenfalls gemessen werden.

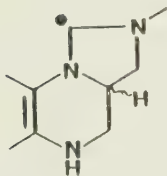
Solange nicht die NMR.-Daten eines Carbinolamins, das als Modell für die Alternativstruktur 37 gelten kann, bekannt sind, ist der ^1H -NMR.-Beweis der Methylenbrückenstruktur im aktiven Formaldehyd mangelhaft.

In den Untersuchungen von Viscontini und Bieri über die Anlagerung von Formaldehyd an Tetrahydrofolsäureanalogue mittels ^1H -NMR. konnte keine Imidazolidinrinstruktur beobachtet werden [44].

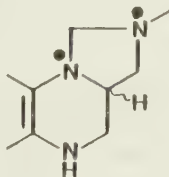
Das Vorhandensein einer Methylenbrücke im aktiven Formaldehyd erschien uns wohl als wahrscheinlich, in Anbetracht der genannten Umstände jedoch noch nicht als eindeutig bestätigt. Deshalb versuchten wir in der vorliegenden Arbeit einen eindeutigen Beweis für die Imidazolidinringstruktur zu erbringen, was mit Hilfe der ^{13}C - und der ^{15}N -NMR.-Spektroskopie erreicht wurde.

2. Die Bestätigung der Struktur von 5,10-Methylen-(6R,S)- 5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure

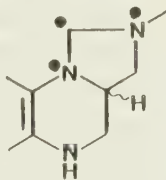
Die oben erwähnte Bestätigung wurde durch die ^{13}C - und ^{15}N -NMR.-Spektren der folgenden Verbindungen erbracht:
 (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (FH_4), (Formel und Nummerierung siehe S.15)*;
 5,10-Methylen-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure ($\text{CH}_2\text{-FH}_4$), (Formel siehe S.18)*;
 $^{13}\text{C}(11)$ -5,10-Methylen-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure ($\text{c}(11)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$);
 $^{15}\text{N}(5)$, $^{15}\text{N}(10)$ -5,10-Methylen-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure ($\text{n}(5), \text{n}(10)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$);
 $^{13}\text{C}(11)$, $^{15}\text{N}(5)$, $^{15}\text{N}(10)$ -5,10-Methylen-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure ($\text{c}(11), \text{n}(5), \text{n}(10)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$);



$\text{c}(11)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$



$\text{n}(5), \text{n}(10)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$



$\text{c}(11), \text{n}(5), \text{n}(10)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$

* Bei den angegebenen Formeln handelt es sich um die natürlichen 6S- bzw. 6R-Konfigurationen.

2.1. ^{13}C -NMR.-Spektrum von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$

Zu einer 0,1 M Lösung des Dianions von FH_4 in D_2O bei pD 7 wurde ein Moläquivalent Formaldehyd gegeben und direkt das ^{13}C -Spektrum von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ gemessen. Ein Ueberschuss des Formaldehyds wurde vermieden, um eine mögliche Ueberaddition zu verhindern (siehe Kap. 3). Andernseits musste gewährleistet sein, dass, in Anbetracht des Vorliegens einer Gleichgewichtsreaktion mit $K = 2,5 \cdot 10^3 \text{ Mol}^{-1} \text{ l}$ (Kap. 1.3.), ein genügend grosser Anteil der Edukte umgesetzt wird. Die Rechnung ergibt einen Umsatz von 94% der Edukte, was für ein ^{13}C -Spektrum ausreichend ist.

Für die Zuordnung des ^{13}C -Spektrums von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ (Fig. 1, Tabelle 2) wurde dasjenige von FH_4 (Tabelle 2)[45] herangezogen.

Die C-Resonanzen des p-Aminobenzoyl-L-glutaminsäure-Teils haben mit Ausnahme von C(4') in beiden Spektren die gleiche chemische Verschiebung.

Im off-resonance-Spektrum kann man C(6) (Dublett) von C(9) und C(7) (je ein Triplett) unterscheiden. Durch das Auftreten einer $^1\text{J}_{\text{CN}}$ -Kopplung zwischen C(9) und N(10) (siehe Kap. 2.3) können die Signale von C(9) und C(7) auseinandergehalten werden. Die Resonanz von C(4') kann ebenfalls durch das Vorhandensein einer $^1\text{J}_{\text{CN}}$ -Kopplung identifiziert werden. Für die Resonanzen von C(4), C(2) und C(8a) von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ wurde die gleiche Reihenfolge wie in FH_4 angenommen, da die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen gering sind.

Durch Synthese von c(11)- $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ mit H^{13}CHO wurde die Resonanz von C(11) ermittelt.

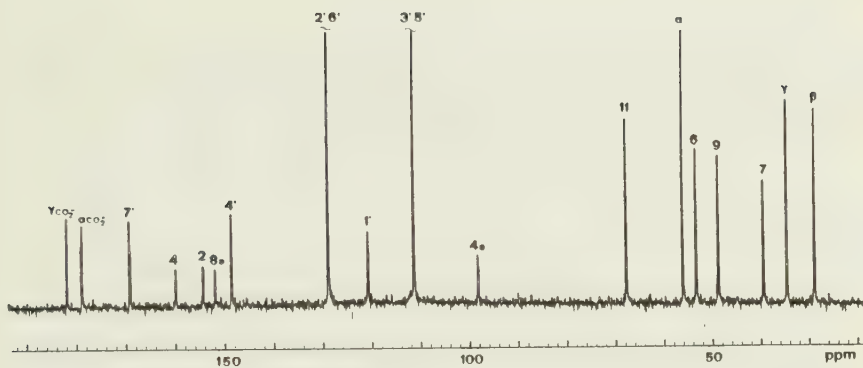


Fig. 1 ^{13}C -FT-NMR.-Spektrum (50,4 MHz) von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ in D_2O ; 0,1 M, pD = 7.

Tabelle 2

^{13}C -chemische Verschiebungen von FH_4 (1) [45] und $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ (2); δppm relativ zu TMS, D_2O , pD = 7.

	<u>1</u>	<u>2</u>		<u>1</u>	<u>2</u>
C(β)	: 28,5	28,6	C(1')	: 120,8	120,8
C(γ)	: 34,2	34,4	C(2'), C(6')	: 129,0	128,9
C(7)	: 43,3	39,2	C(4')	: 150,8	148,7
C(9)	: 44,7	48,5	C(8a)	: 151,6	152,0
C(6)	: 48,3	53,6	C(2)	: 157,5	154,5
C(α)	: 55,8	55,9	C(4)	: 166,5	160,1
C(11)	:	67,4	C(7')	: 169,4	169,5
C(4a)	: 101,0	98,2	$\text{CO}_2^-(\alpha)$	: 179,3	179,1
C(3'), C(5')	: 112,0	111,3	$\text{CO}_2^-(\gamma)$	: 182,3	182,2

Bei der Mehrheit der Signale beobachtet man eine Verdopplung, die durch das Vorliegen eines Gemisches des 6R- und des 6S-Diastereomeren bedingt ist (Fig. 2).

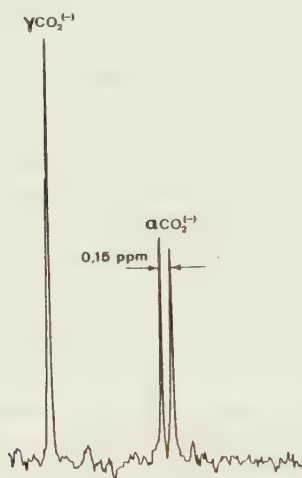


Fig. 2 Ausschnitt aus dem ^{13}C -FT-NMR.-Spektrum von $\text{CH}_2\text{-FH}_2$ in D_2O ; 0,1 M, pD = 7

Damit ist erstmals NMR.-spektroskopisch der Nachweis dafür erbracht, dass bei der chemischen Reduktion der 5,6-Doppelbindung in FH_2 beide möglichen Diastereomeren gebildet werden.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ das einzige tetrahydrierte Folsäure-Derivat ist, in dessen NMR.-Spektrum die Diastereomeren durch Signalverdoppelung sichtbar werden, kann darin gesucht werden, dass die beiden relativ weit voneinander entfernten chiralen Zentren C(α) und C(6) über die Methylenbrücke zusätzlich verbunden werden.

Bei den bis zur Basislinie aufgetrennten Signalen (Fig. 2) erkennt man, dass beide Diastereomeren ungefähr gleich häufig gebildet werden.

Im ^{13}C -NMR.-Spektrum von $c(11)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$ wurden keine $^2J_{\text{CNC}}$ -Kopplungen zwischen $\text{C}(11)$ und $\text{C}(4')$, $\text{C}(9)$, $\text{C}(6)$ oder $\text{C}(4a)$ gemessen, die eventuell eine Bestätigung des Imidazolidinrings ergeben hätten.

2.2. ^{15}N -NMR.-Spektren von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ und FH_4

Die Erwartung, in der $^{15}\text{N}(5)$ - und $^{15}\text{N}(10)$ -Resonanz von $c(11)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$ eine Aufspaltung durch $^{13}\text{C}(11)$ zu beobachten, veranlasste uns zur Aufnahme des ^{15}N -NMR.-Spektrums von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ bei neutralem pH und natürlicher Häufigkeit (Fig. 3, Tabelle 3).

Die hohe Viskosität der Messlösung bei der notwendigen hohen Konzentration (ca 0,9 M) und das Vorhandensein von zwei tertiären Stickstoffatomen 5 und 10 in $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ mit langen Relaxationszeiten machten extrem lange Messzeiten erforderlich.

Um die Zuordnung des ^{15}N -Spektrums von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ zu vereinfachen wurde ein ^{15}N -Spektrum von FH_4 bei pH 7 aufgenommen (Fig. 4, Tabelle 3), da das ^{15}N -Spektrum von FH_4 in 6N HCl (Tabelle 3) bereits beschrieben ist [46].

Bei pH 7 liegt FH_4 als Dicarboxylatanion vor, während in 6N HCl die Stickstoffatome 1, 5 und 10 protoniert sind. Es ist daher zu erwarten, dass die Resonanzen dieser Atome in der freien und in der protonierten Form unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen.

Das Verhalten der Resonanz von $\text{N}(1)$ bei der Protonierung wurde am Beispiel von 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin untersucht [46]. In Trifluoressigsäure sind $\text{N}(1)$ und $\text{N}(5)$ protoniert; die chemische Verschiebung von $\text{N}(1)$ beträgt -269,4 ppm. Nach der Zugabe von einem Moläquivalent Natriumhydroxid liegt $\text{N}(1)$ in der freien Form vor und die Stickstoffresonanz erleidet eine Verschiebung nach tieferem Feld zu -227,9 ppm. Dieser Wert liegt immer noch um 21,1 ppm tiefer

als derjenige von $-206,8$ ppm für N(1) von FH_4 bei neutralem pH, doch die Abwesenheit von anderen Signalen in dieser Region macht diese Zuordnung sehr wahrscheinlich.

Die Resonanz von N(5) in FH_4 wird durch die Protonierung des Stickstoffatoms um $2,1$ ppm nach tieferem Feld verschoben.

Eine gleichgerichtete Verschiebung um $2,2$ ppm beobachtet man bei der Protonierung von Piperidin [47].

Die N(10)-Resonanz erleidet bei der Protonierung eine Verschiebung von $7,7$ ppm nach höherem Feld. Ebenfalls nach höherem Feld verschoben ist die Resonanz des Aniliniumions gegenüber derjenigen von Anilin ($\Delta\delta = 8,7$ ppm) [47].

Im ^{15}N -Spektrum von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ können nur sechs der erwarteten sieben Resonanzen gefunden werden. Es ist nicht wahrscheinlich, dass die fehlende Linie wegen eines ungünstigen NOE oder extrem langer Relaxationszeit des Stickstoffs nicht entdeckt wurde, da mehrere Spektren jeweils unter verschiedenen Bedingungen aufgenommen wurden. Der Vergleich des ^{15}N -Spektrums von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ mit demjenigen von FH_4 legt die Vermutung nahe, dass die Resonanz von N(8) mit derjenigen von N(10) zusammenfällt.

Die Resonanzen von N(5) und N(10) sind in $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ gegenüber FH_4 nach tieferem Feld verschoben ($\Delta\delta = +3,1$ bzw. $+3,6$ ppm, siehe Tabelle 3). Eine gleichgerichtete Verschiebung der N-Resonanz wird beim Uebergang von Anilin zu N-Aethylanilin, sowie von Diäthylamin zu Triäthylamin ($\Delta\delta = +14,6$ bzw. $+4,4$ ppm [47]) beobachtet. Eine N-Methylierung von Anilin und Diäthylamin verursacht eine entgegengesetzte Verschiebung ($\Delta\delta = -3,7$ bzw. $-5,1$ ppm [47]). Man könnte daraus schliessen, dass bei der Bildung des Formaldehydaddukts die H-Atome sowohl an N(5), als auch an N(10) je durch einen Substituenten $-\text{CH}_2\text{-X}$ (Methylenbrücke oder Hydroxymethylierung) ersetzt wird, wobei eine zweifache Hydroxymethylierung aufgrund der experimentellen Bedingungen ausgeschlossen werden muss.

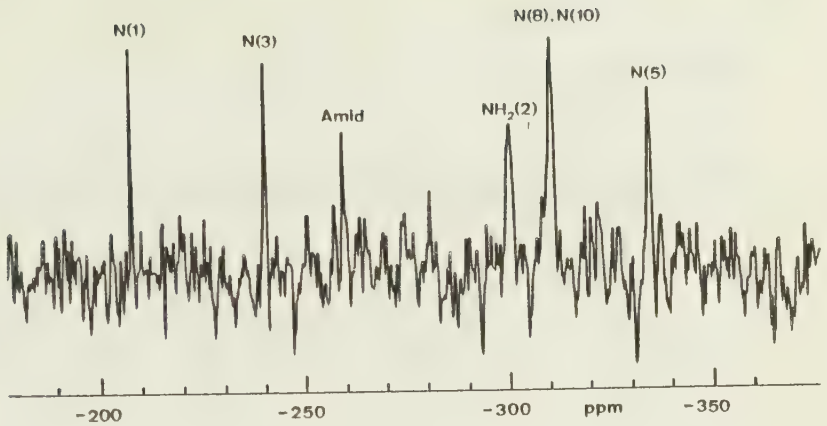


Fig. 3 ^{15}N -FT-NMR.-Spektrum (10,1 MHz) von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ (0,8 M) in natürlicher Häufigkeit; $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 92:8; pH = 7; δppm relativ zu externem CH_3NO_2 .

Tabelle 3

^{15}N -chemische Verschiebungen von FH_4 (1) (1a: $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 92:8; pH = 7. 1b: 6 N HCl [46]) und $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ (2) ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 92:8; pH = 7); δppm relativ zu externem CH_3NO_2 .

Verbin- dungen	N(1)	N(3)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{NH}- \end{array}$	NH_2	N(8)	N(10)	N(5)
<u>1a</u>	-206,8	-240,4	-258,8	-302,0	-309,6	-312,0	-337,6
<u>1b</u>	-267,7	-242,8	-261,4	-295,5	-303,6	-319,7	-335,5
<u>2</u>	-207,7	-240,5	-260,8	-298,5	-308,4	-308,4	-334,5

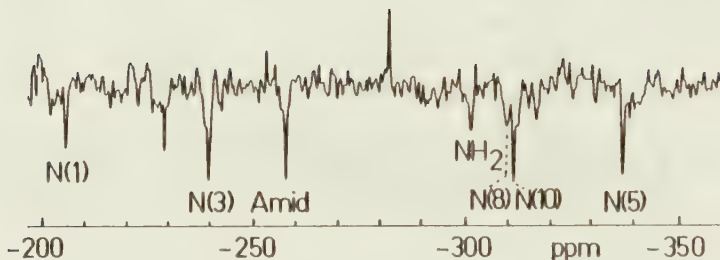


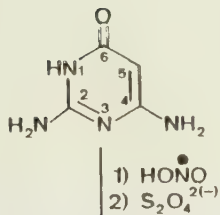
Fig. 4 ^{15}N -FT-NMR.-Spektrum (10,1 MHz) von FH_4 (0,8 M) in natürlicher Häufigkeit; $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 92:8; pH = 7; 6ppm relativ zu externem CH_3NO_2 .

2.3. ^{13}C -NMR.-Spektrum von c(11),n(5),n(10)- CH_2 - FH_4

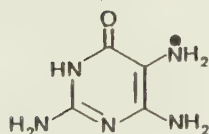
Da die Resonanzen von N(8) und N(10) in CH_2 - FH_4 zusammenfallen, konnte das beabsichtigte Ziel der Messung der $^1\text{J}_{\text{CN}}$ -Kopplungen zwischen C(11) und N(5), bzw. N(10) im ^{15}N -Spektrum von c(11)- CH_2 - FH_4 nicht weiter verfolgt werden.

Aus diesem Grunde sollten die Kopplungen im ^{13}C -Spektrum gemessen werden, was die Synthese von c(11),n(5),n(10)- CH_2 - FH_4 erforderlich machte, welche gemäss Schema 13 erfolgte. (Die Einführung eines ^{13}C -markierten C(11) ist für die Messung der $^1\text{J}_{\text{CN}}$ -Kopplungen im ^{13}C -Spektrum nicht nötig und geschah lediglich, um ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis für die Resonanz von C(11) zu erzielen).

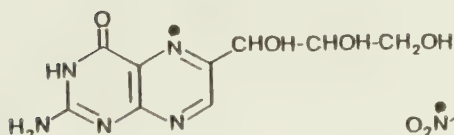
41



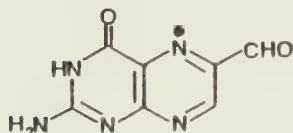
42



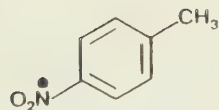
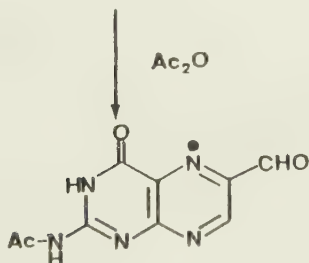
43



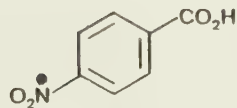
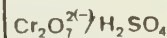
44



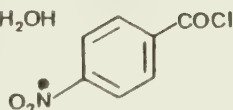
45



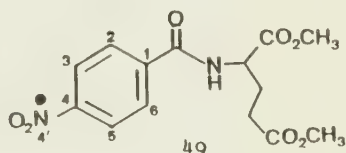
46



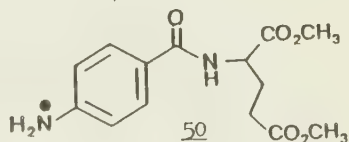
47



48



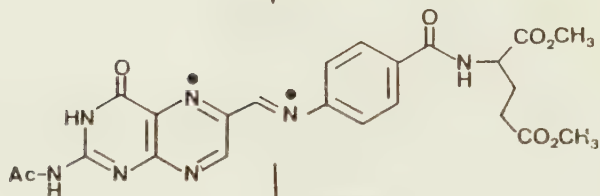
49



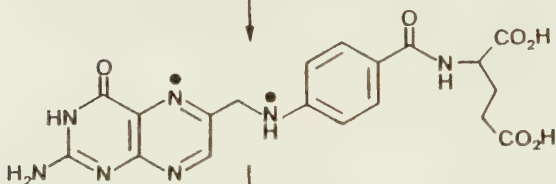
50

$-\text{H}_2\text{O}$

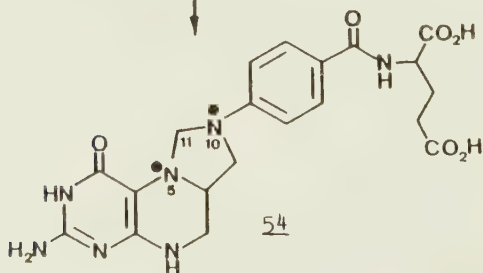
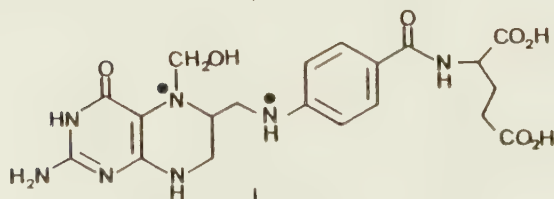
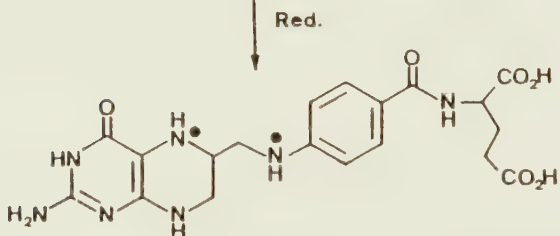
51



52



53



Schema 13

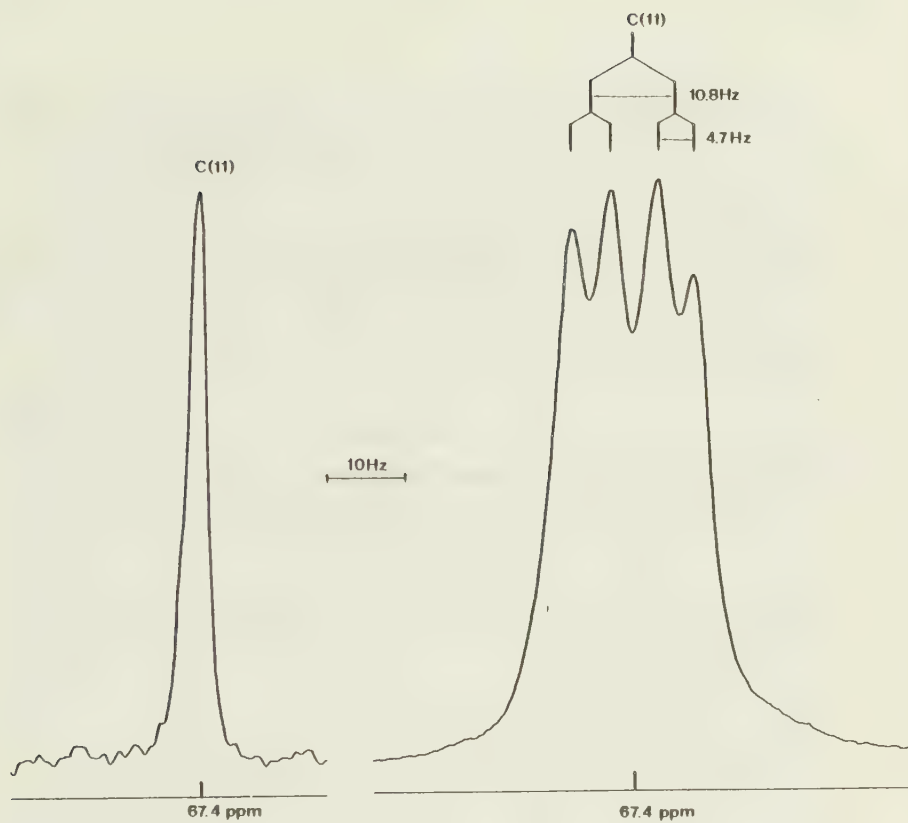


Fig. 5 Ausschnitt aus dem ^{13}C -FT-NMR.-Spektrum (50,4 MHz) von $\text{c}(11)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$ (links) und $\text{c}(11),\text{n}(5),\text{n}(10)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$ (rechts) im Bereich der C(11)-Resonanz; D_2O (0,1 M, $\text{pD}=7$)

Im ^{13}C -Spektrum von $c(11), n(5), n(10)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$ ist die Resonanz von C(11) in ein Dublett mal Dublett aufgespalten (Fig. 5, Spektrum rechts). Die Kopplungskonstanten betragen 4,7 und 10,8 Hz. Dass dieses Aufspaltungsmuster nicht teilweise durch die Anwesenheit der zwei (6R,S)-Diastereomeren von $c(11), n(5), n(10)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$ bedingt ist, zeigt die Resonanz von C(11) in $c(11)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$, welche aus einer einzigen Linie besteht (Fig. 5, Spektrum links).

Das Vorhandensein zweier C,N-Kopplungen zu C(11) beweist eindeutig das Vorliegen einer Methylenbrücke zwischen N(5) und N(10). Damit ist die Struktur von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ bestätigt.

Zur Zuordnung der Kopplungskonstanten zu C(11) wurden diejenigen zwischen N(5) bzw. N(10) und den ihnen benachbarten C-Atomen herangezogen (Tabelle 4).

Grosse Kopplungskonstanten zeigen die zu N(10) benachbarten Kohlenstoffatome C(9) und C(4') (9,9 bzw. 16,0 Hz).

Die Kopplungskonstante von 10,8 Hz im Resonanzsignal von C(11) (Fig. 5) wird somit von N(10) verursacht, während der kleinere Wert von 4,7 Hz typisch ist für die Kopplung zwischen einem $\text{sp}^3\text{-C}$ - und einem annähernd sp^3 -hybridisierten N-Atom, wie ein Vergleich mit Methylamin zeigt ($^1J_{\text{CN}} = 4,5 \text{ Hz}$ [47]).

Tabelle 4

$^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten im ^{13}C -NMR.-Spektrum von $c(11), n(5), n(10)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$ (in Hz $\pm 0,2 \text{ Hz}$ angegeben).

N(5), C(4a) : 8,0	N(10), C(4') : 16,0
N(5), C(6) : 3,6	N(10), C(9) : 9,9
N(5), C(9) : 2,0	N(10), C(11) : 10,8
N(5), C(11) : 4,7	

2.4. ^{15}N -NMR.-Spektren von c(11),n(5),n(10)-CH₂-FH₄ und
n(5),n(10)-CH₂-FH₄

Anstatt in die erwarteten Dubletts werden die $^{15}\text{N}(5)$ - und $^{15}\text{N}(10)$ -Resonanzen von c(11),n(5),n(10)-CH₂-FH₄ in unaufgelöste Multipletts aufgespalten (Fig. 7). Eine Erklärung für dieses Phänomen brachten die Spektren der in C(11) nicht angereicherten n(5),n(10)-CH₂-FH₄ bei 20,2 (Fig. 6) und 10,1 MHz.

Für N(5) und N(10) erscheinen durch das Vorliegen zweier Diastereomeren je zwei Resonanzlinien ($\Delta\delta = 0,24$ ppm). Diese sind durch eine $^2J_{\text{NN}}$ -Kopplung von 2 Hz je in ein Dublett aufgespalten. Das Auftreten dieser Kopplung ist ein weiterer Hinweis für die Methylenbrücke, denn eine $^3J_{\text{NCN}}$ -Kopplung über die Atome 5-6-9-10 kann nicht mehr beobachtet werden.

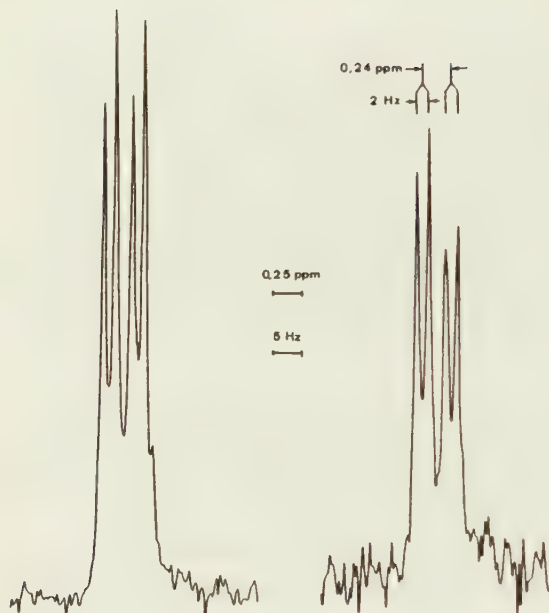


Fig. 6

Ausschnitt aus dem ^{15}N -NMR.-Spektrum (20,2 MHz) von $n(5),n(10)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$ im Bereich der $\text{N}(10)$ - (links) und der $\text{N}(5)$ -Resonanzen (rechts); D_2O ; 0,05 M; $\text{pD} = 7$.

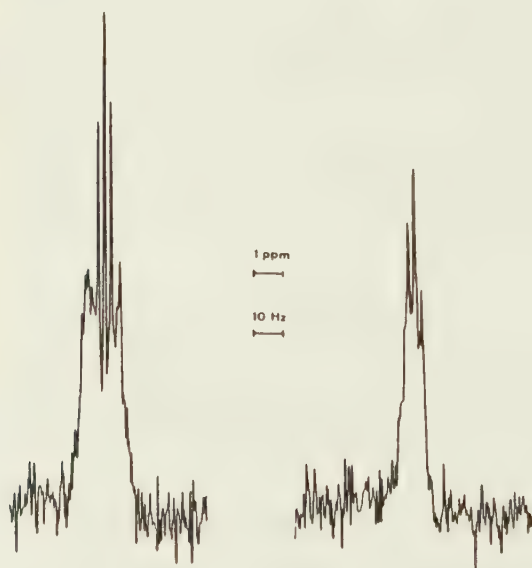


Fig. 7

Ausschnitt aus dem ^{15}N -NMR.-Spektrum (10,1 MHz) von $c(11),n(5),n(10)\text{-CH}_2\text{-FH}_4$ im Bereich der $\text{N}(10)$ - (links) und der $\text{N}(5)$ -Resonanzen (rechts); D_2O ; 0,05 M; $\text{pD} = 7$.

2.5. Die Konformation von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$

Aus den N,C-Kopplungskonstanten von N(10) mit C(11), C(9) und C(4') in c(11),n(5),n(10)- $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ lässt sich nach [48] der Hybridisierungsindex von N(10) abschätzen. Es ergibt sich ein s-Anteil von $34 \pm 3\%$; N(10) ist also ein planarer Anilinstickstoff.

Aufgrund des Vorliegens eines sp^3 -hybridisierten N(5) und eines sp^2 -hybridisierten N(10) kann man für $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ die in Fig. 8 abgebildete Konformation vorschlagen. Poe et al [49] haben in ihrer Konformationsanalyse des Imidazolidinrings von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ aufgrund von $^1\text{H-NMR}$ -Daten eher ein sp^3 -hybridisiertes N(10) angenommen.

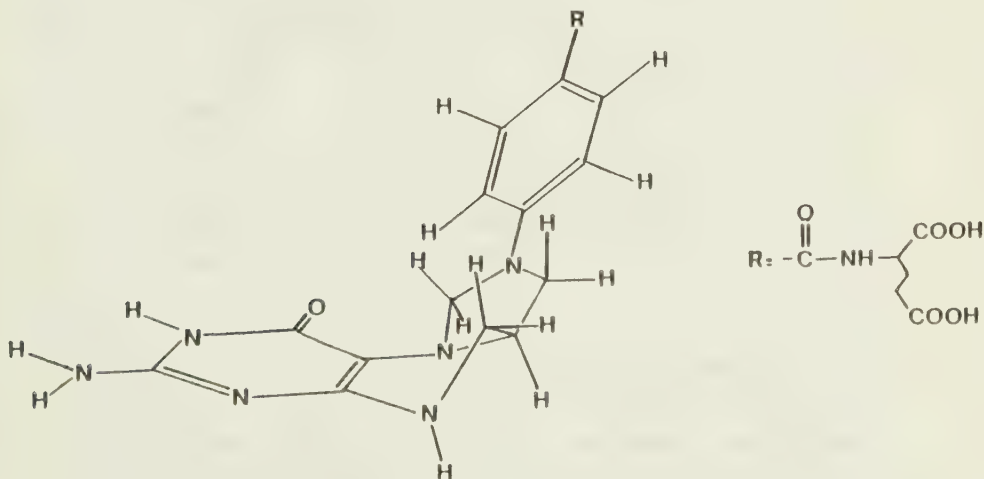
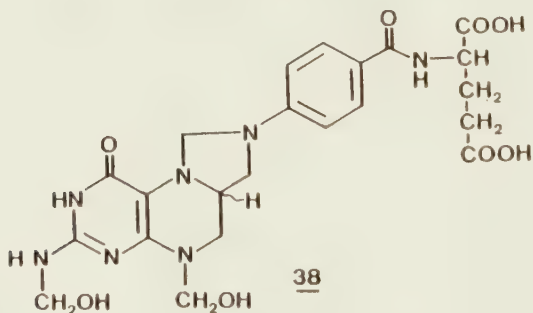


Fig. 8

3. Die Reaktion von FH_4 mit einem Formaldehyd-Ueberschuss

In seiner spektrophotometrischen Studie über die Anlagerung von Formaldehyd an Pterine und Folsäure-Derivate [35] konnte Blakley nachweisen, dass tetrahydrierte Pterine ausser mit N(5) noch mit weiteren Stickstoffatomen Formaldehyd binden können. Aufgrund seiner Resultate schlug er als Bindungsstellen für Formaldehyd N(3) und N(8) vor.

Durch die unten beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, dass bei der Reaktion von FH_4 mit einem Formaldehyd-Ueberschuss 5,10-Methylen-2',8-dihydroxymethyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (38) gebildet wird.



3.1. ^{13}C -NMR.-Spektrum von 38

Das ^{13}C -NMR.-Spektrum von FH_4 ($c = 0,1 \text{ M}$) in Gegenwart eines 5-fachen Ueberschusses an Formaldehyd ($c = 0,5 \text{ M}$, oder höher) (Fig. 9, Tabelle 4) zeigt, dass insgesamt 3 Moleküle Formaldehyd an FH_4 angelagert werden (Signale 11, 12 und 13).

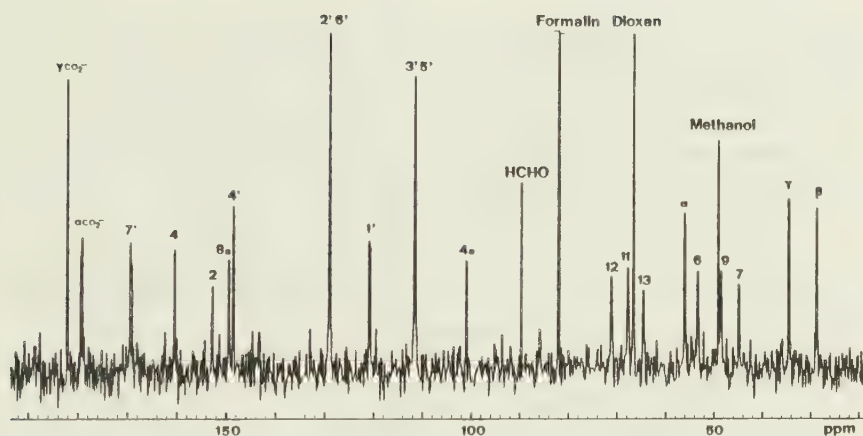


Fig. 9 ^{13}C -FT-NMR.-Spektrum (50,4 MHz) von 38 in D_2O
(0,1 M FH_4 + 0,5 M HCHO ; pD = 7)

Tabelle 4

^{13}C -chemische Verschiebungen von 38; 6ppm relativ
zu TMS, D_2O , pD = 7.

$\text{C}(\beta)$:	28,6	$\text{C}(13)$	:	64,5	$\text{C}(4')$	:	184,4
$\text{C}(\gamma)$:	34,4	$\text{C}(11)$	:	67,6	$\text{C}(8a)$	:	149,3
$\text{C}(7)$:	44,7	$\text{C}(12)$	:	71,0	$\text{C}(2)$	:	152,6
$\text{C}(9)$:	48,4	$\text{C}(4a)$	:	100,7	$\text{C}(4)$	:	160,4
$\text{C}(6)$:	53,2	$\text{C}(3'), \text{C}(5')$	:	111,3	$\text{C}(7')$	:	169,3
$\text{C}(\alpha)$:	56,0	$\text{C}(1')$	:	120,7	$\text{CO}_2^-(\alpha)$	:	179,0
		$\text{C}(2'), \text{C}(6')$	:	128,8	$\text{CO}_2^-(\gamma)$	:	182,0

Die Zuordnung der Resonanzen, ausser denjenigen von C(12), C(11), und C(13), erfolgte durch Vergleich mit dem ^{13}C -Spektrum von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$; 4 Signale erscheinen in den beiden Spektren bei einer geringfügig unterschiedlichen chemischen Verschiebung, während die übrigen identisch sind.

Obwohl C(11) im ^{13}C -Spektrum von 38 die gleiche chemische Verschiebung aufweist wie C(11) im ^{13}C -Spektrum von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ (2) (67,6 bzw 67,4 ppm), darf daraus nicht unbedingt geschlossen werden, dass C(11) in 38 ebenfalls einer Methylenbrücke angehört, da die Möglichkeit einer N(5),N(10)-Dihydroxymethylierung in Erwägung gezogen werden muss.

In der $^{15}\text{N}(5)$, $^{15}\text{N}(10)$ -markierten Additionsverbindung, gebildet aus n(5),n(10)- $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ und einem Ueberschuss an Formaldehyd, zeigt die Resonanz von C(11) das gleiche Aufspaltungsmuster wie diejenige von C(11) in c(11),n(5),n(10)- $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ (Fig. 5). Das bedeutet, dass die 5,10-Methylenbrücke in Anwesenheit eines Formaldehyd-Ueberschusses erhalten bleibt.

Die Kohlenstoffatome 12 und 13 in 38 stammen demnach von am Pterinkern substituierten N-Hydroxymethylgruppen. Für eine Addition können die Stickstoffatome 2', 3 und 8 in Betracht gezogen werden. Zur Signalzuordnung wurden Folsäure-Derivate mit den entsprechenden geschützten Stickstoffatomen mit Formaldehyd umgesetzt und die ^{13}C -Spektren aufgenommen (Fig. 10).

Versetzt man 2'-Acetyl-(6R,S)-5,6,7,8- tetrahydro-L-folsäure (39) mit einem Ueberschuss an Formaldehyd, so erscheinen im ^{13}C -Spektrum die 3 Signale 11, 12, und 13 bei fast gleicher chemischer Verschiebung (67,3; 71,0 und 64,3 ppm) wie die entsprechenden Signale im ^{13}C -Spektrum von 38.

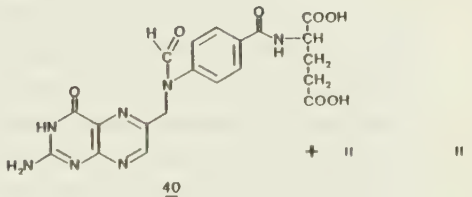
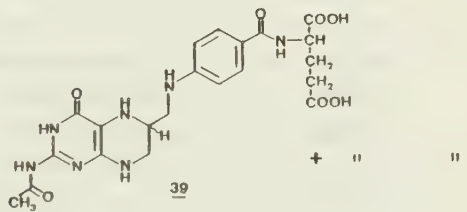
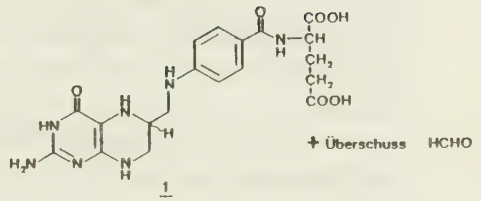
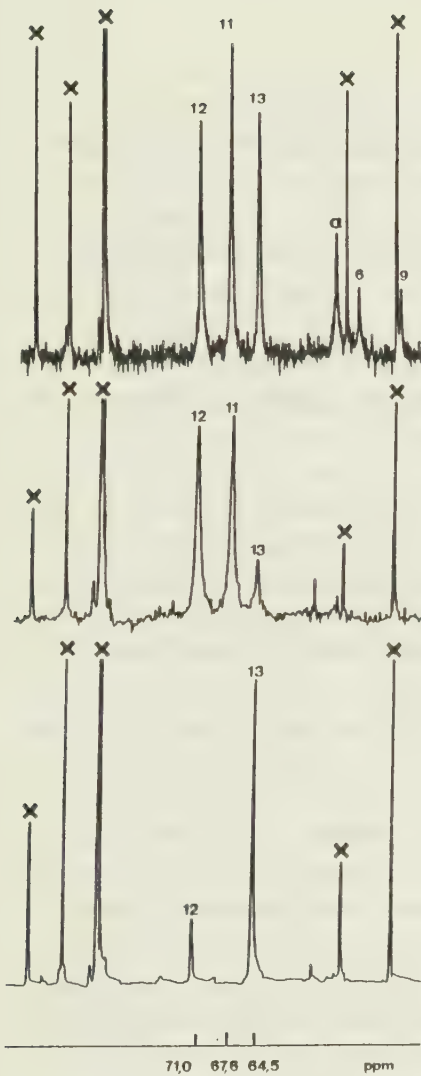


Fig. 10 Ausschnitt aus den ^{13}C -NMR.-Spektren (25,2 MHz) der angegebenen Verbindungen (D_2O , 0,1 M, $\text{pD} = 7$) in Gegenwart von HCHO (0,5 M) (10% - [bei 1] und 95% - [bei 39 und 40] ^{13}C -angereicht), im Bereich der Resonanzen von C(11), C(12) und C(13). x = Resonanzen von Verbindungen, die in der Formaldehyd-Lösung enthalten sind.

Signal 13 ist in seiner Intensität stark herabgesetzt. Da in 39 die Stellung 2' geschützt ist, kann das reduzierte Signal 13 der 2'-Hydroxymethylgruppe zugeordnet werden.

In 10-Formyl-L-folsäure (40) sind die Stickstoffatome 5, 8 und 10 einer Addition durch Formaldehyd nicht mehr zugänglich.

Nach der Zugabe von Formaldehyd findet man im ^{13}C -Spektrum die Signale 12 und 13 bei 71,7 und 64,5 ppm. 12 ist stark vermindert, woraus geschlossen werden kann, dass Signal 12 die Resonanz des 8-Hydroxymethyl-Kohlenstoffatoms ist.

Anhand dieser Informationen kann die Formel 38 aufgeschrieben werden. Eine Bestätigung der Struktur 38 ergibt sich aus den Unterschieden der ^{13}C -chemischen Verschiebungen von 3 und 38, die in der folgenden Aufstellung angegeben sind:

$$\Delta\delta \text{ ppm} = \delta_{38} - \delta_3 : \text{C}(7): 5,5; \text{C}(4a): 2,5; \text{C}(8a): -2,7; \\ \text{C}(2): -1,9.$$

Die Resonanz von C(7) in 38 ist gegenüber derjenigen in 3 um 5,5 ppm nach tieferem Feld verschoben, was zu vergleichen ist mit der Verschiebung um 9,5 ppm in die gleiche Richtung von C(2) in Piperidin nach der N-Methylierung [50]. Die Substitution von N(8) bewirkt eine Verschiebung der C(8a)-Resonanz um 2,7 ppm nach höherem Feld. Ebenfalls nach höherem Feld wird die C(1)-Resonanz von N-Methylanilin beim Uebergang zu N,N-Diäthylanilin verschoben ($\Delta\delta = 2,4$ ppm) [50]. Das Nicht-Erfolgen einer Formaldehyd-Addition an N(3) kann mit der Abwesenheit eines $\Delta\delta$ ppm bei C(4) begründet werden. Bei einer Methylierung von Methylformamid erleidet die C-Resonanz eine Verschiebung um 4 ppm nach höherem Feld [50].

Die Reversibilität der Addition von Formaldehyd an FH_4 (siehe Kap. 1.3.) hat sich durch folgendes Experiment bestätigt.

Zunächst wurde aus FH_4 ($c = 0,1 \text{ M}$) durch die Zugabe von einem Moläquivalent Formaldehyd $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ hergestellt. Danach wurden 4 Moläquivalente 10 % ^{13}C -angereicherter Formaldehyd hinzugefügt. Die Resonanzen von C(11), C(12) und C(13) in der resultierenden Verbindung wiesen alle die gleiche Intensität auf, bedingt durch die Austauschbarkeit von C(11) in $\text{CH}_2\text{-FH}_4$.

Die 2'- und 8-Hydroxymethylgruppen sind nicht säurebeständig. Durch Fällern von 38 bei pH 3,5 (Neutralisation des Glutamat-anions) mit Salzsäure entsteht $\text{CH}_2\text{-FH}_4$.

Es konnte keine Verbindung aus der Addition von nur 2 Molekülen Formaldehyd an FH_4 beobachtet werden. Bei einer kontinuierlichen Erhöhung der Zugabe von Formaldehyd zu FH_4 ($c = 0,1 \text{ M}$) kann man bei einem Gehalt von 2,5 Moläquivalent Aldehyd im ^{13}C -Spektrum $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ und 38 in etwa gleichen Anteilen nebeneinander nachweisen.

3.2. Die Reduktion der 5,10-Methylenbrücke durch Formaldehyd

Nimmt man mehrere ^{13}C -Spektren von 38 ($c_{\text{FH}_4} = 0,1 \text{ M}$, $c_{\text{HCHO}} = 0,5 \text{ M}$; pH = 6) hintereinander auf, so beobachtet man das langsame Verschwinden der C(11)-Resonanz bei 67,6 ppm und das Entstehen von zwei neuen Resonanzen bei 42,3 und 165,4 ppm. Die erste ist das Signal der N(5)-Methylgruppe und die zweite dasjenige von Ameisensäure. Folglich wirkt hier der Formaldehyd als Reduktionsmittel in Analogie zur Cannizzaro-Reaktion, mit der Besonderheit, schon bei neutralem pH aktiv zu sein.

4. Experimenteller Teil

Die ^{15}N - und ^{13}C -FT.-NMR.-Spektren wurden auf einem Varian-XL-100-15- bzw. XL-200-Spektrographen aufgenommen. δ -Werte $\pm 0,4$ ppm. Die Proben wurden unter Inertgas (Argon) gemessen. Für die Aufnahme der ^{15}N -NMR.-Spektren wurden in natürlicher Häufigkeit des Isotops bei einer Messkonzentration von 0,8 - 0,9 M 12000 Akkumulationen verwendet (Resonanzfrequenz 10,1 MHz, 70° Flipwinkel, 10 sec Pulsabstand). Alle sauerstoffempfindlichen Arbeiten wurden unter Argon ausgeführt.

2. $^{15}\text{N}(5')$ -6-Hydroxy-2,4,5-triamino-pyrimidinsulfat ($42 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$)

Die Synthese erfolgte nach [51] unter Verwendung von 1g markiertem NaNO_2 (95 % ^{15}N , Stohler-Isotope-Chemicals), wobei jedoch 41 in äquimolarer Menge zu NaNO_2 eingesetzt wurde.

3. $^{15}\text{N}(5)$ -L-Neopterin (43). Die Synthese erfolgte nach [52] und [53], wobei jedoch das $42 \cdot \text{HCl}$ [52] nicht isoliert wurde. Anstatt das Thiol wurden 300mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ auf 2,58g 42· H_2SO_4 als Antioxidans zugefügt.

4. $^{15}\text{N}(5)$ -6-Formylpterin (44). Die Synthese erfolgte nach [54].

5. $^{15}\text{N}(5)$ -N(2')-Acetyl-6-formylpterin (45). Die Synthese erfolgte nach [55], jedoch unter Verwendung von nur 380ml Acetanhydrid für 1,29g 44.

6. ^{15}N -p-Nitrobenzoesäure (47). Die Synthese erfolgte nach [56] aus markiertem p-Nitrotoluol (46) (95 % ^{15}N , CEA). Das Reaktionsgemisch wurde im Gegensatz von [56] unter Rückfluss gehalten. Um eine Kristallisation von 46 am Rückflusskühler zu verhindern musste die Kühlwassertemperatur auf 55° eingestellt werden.

7. ^{15}N -p-Nitrobenzoylchlorid (48). Die Synthese erfolgte nach [57], jedoch unter Verwendung der 10-fachen Lösungsmittelmenge.

8. ^{15}N (4)-p-Nitrobenzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester (49). Eine Lösung von 2,5g (11,8 mmol) L-Glutaminsäure-dimethylester-hydrochlorid und 2,0g NaHCO_3 in 30ml H_2O wurde langsam zu einer Lösung von 1,15g (6,2 mmol) 48 in 30ml Aceton gegeben und während 3Std. gerührt. 49 fällt nach Abdestillation des Acetons unter reduziertem Druck aus. Anschliessend wurde die Wasserphase mit CHCl_3 extrahiert, dieser Extrakt mit einer 5 % igen NaHCO_3 -Lösung gewaschen und unter reduziertem Druck zur Trockene eingengt. Der ölige Rückstand wurde mit Wasser zur Kristallisation gebracht, abfiltriert und getrocknet (22° , 4 Std., 0,01 Torr). Das nicht reagierte 47 wurde durch Ansäuern der Wasserphasen zurückgewonnen, zu 48 umgesetzt und erneut mit L-Glutaminsäure-dimethylester-hydrochlorid zur Reaktion gebracht. 1,15g (56,8 %) 49.

9. ^{15}N (4)-p-Aminobenzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester (50). In 200 ml Aethanol wurden 1,15 g (3,52 mmol) 49 gelöst, 100 mg PtO_2 zugefügt und hydriert (25° , 1 Std., 1bar). Nach beendeter H_2 -Aufnahme wurde abfiltriert, der Aethanol abdestilliert und 50 getrocknet (22° , 4 Std., 0,01 Torr): 1,05 g (100 %).

10. ^{15}N (5), ^{15}N (10)-N(2')-Acetyl-6-[N-(p-benzoyl-L-glutaminsäure-dimethylester)-azomethin]-pterin (51). Kondensation nach [58], wobei jedoch 50 in einem nur 10 %igen Ueberschuss gegenüber 45 eingesetzt, die Reaktionslösung hingegen 45 Min. rückflusiert wurde. Umkristallisation von 51 aus CH_3CN .

11. $^{15}\text{N}(5), ^{15}\text{N}(10)$ -Folsäure (52). Die Reduktion und Hydrolyse von 51 zu 52 erfolgte nach [55].

12. $^{15}\text{N}(5), ^{15}\text{N}(10)$ -(6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure (53). Die Reduktion von 52 zu 53 erfolgte mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ und NaBH_4 und ist im Zusammenhang mit der Synthese von $5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ (Kap. C.3) beschrieben.

13. $^{15}\text{N}(5), ^{15}\text{N}(10)$ -5,10-Methylen-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (54). Das pD einer Lösung von 100mg (0,21 mmol) 53 in 2,1 ml 0,2 N NaOD/D₂O wurde mit 0,2 N NaOD auf 7 eingestellt. Danach wurden 16 μl (0,21 mmol) Formaldehyd (37 - 40 %, FLUKA AG) hinzugefügt und direkt die Spektren gemessen.

14. 5,10-Methylen-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (3). Die Synthese erfolgte wie beschrieben unter 13., jedoch unter Verwendung von unmarkierten Edukten.

15. 2',8-Dihydroxy-5,10-methylen-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure (38). Darstellung analog zu derjenigen von 54, beschrieben in 13., jedoch unter Zugabe von 64 μl (0,84 mmol) Formaldehyd und mit unmarkierten Edukten.

5. Zusammenfassung

Die Richtigkeit der Struktur von 5,10-Methylen-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure wurde mit Hilfe der ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Spektroskopie bestätigt.

Im ^{13}C -NMR.-Spektrum der $^{13}\text{C}(11)$, $^{15}\text{N}(5)$, $^{15}\text{N}(10)$ -markierten Titelverbindung, deren Synthese beschrieben wurde, ist die Resonanz von C(11) in ein Dublett mal Dublett aufgespalten. Die $^1\text{J}_{\text{CN}}$ -Kopplungskonstanten betragen:

N(5) mit C(11): 4,7 Hz

N(10) mit C(11): 10,8 Hz.

Das Vorhandensein zweier C,N-Kopplungen zu C(11) beweist eindeutig das Vorliegen einer Methylenbrücke zwischen N(5) und N(10).

Ein weiterer Hinweis für die Methylenbrücke ist das Auftreten einer $^2\text{J}_{\text{NN}}$ -Kopplung von 2 Hz zwischen N(5) und N(10), die im ^{15}N -NMR.-Spektrum der $^{15}\text{N}(5)$, $^{15}\text{N}(10)$ -markierten Titelverbindung sichtbar ist.

Aus den N,C-Kopplungskonstanten von N(10) mit den benachbarten Kohlenstoffatomen lässt sich ableiten, dass N(10) ein planarer Anilinstickstoff ist. Dies erlaubt einen Vorschlag für die Konformation des Imidazolidinrings in der Titelverbindung.

Durch ^{13}C -NMR.-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass bei der Reaktion von (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure mit einem Formaldehyd-Ueberschuss 5,10-Methylen-2',8-dihydroxymethyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure gebildet wird.

C. Die Synthese von 5-Methyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-
L-folsäure

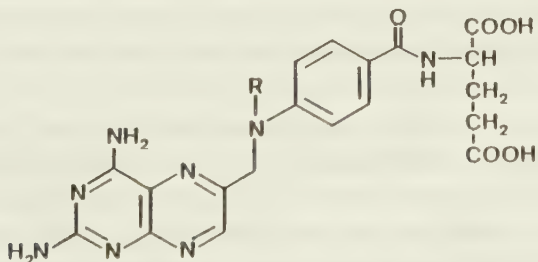
1. Einleitung

Die Bedeutung von $5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ in der Biosynthese von Methionin wurde in Kapitel A.2.3. erwähnt.

Bis jetzt sind einige Synthesen von $5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ publiziert, die alle mehrere chromatographische Reinigungsschritte enthalten. Sie werden in Kapitel 2 besprochen.

Das Bedürfnis nach einer einfachen Methode, $5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ in grossen Mengen zugänglich zu machen ergibt sich aus deren möglichen pharmakologischen Bedeutung. Um dies zu begründen, wird in dieser Einleitung kurz die Biochemie der Chemotherapie von Leukämie mit Folsäureanalogen beschrieben [1][59].

Bei der Chemotherapie von Leukämie werden Folsäureanaloge wie vor allem Methotrexat (55) und Aminopterin (56) eingesetzt. Diese sind irreversible Inhibitoren der Dihydrofolsäure-Reduktase.



55: $\text{R} = \text{CH}_3$

56: $\text{R} = \text{H}$

Im Verlaufe der Synthese von dTMP aus dUMP wird der tetrahydrierte Pyrazinring in $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ zum dihydrierten Pyrazinring von FH_2 oxidiert. Die fortgesetzte Synthese von dTMP erfordert die Regeneration von FH_4 , die dann in der Reaktion von Serin-Transhydroxymethylase wieder in das Substrat für die Thymidylat-Synthetase umgewandelt wird (Kapitel A.2.6.).

Bei der Inhibierung der Dihydrofolsäure-Reduktase durch die erwähnten Folsäureanaloge reichert sich FH_2 an, und damit kommt die Synthese von dTMP zum Stillstand. Als Folge davon kann keine DNA mehr gebildet werden (dTMP ist eines der 4 Nukleotide, aus denen die DNA aufgebaut ist).

Die DNA-Synthese und damit auch diejenige von dTMP ist in Zellen, die sich nicht mehr teilen, gering. Sich teilende Zellen, wie eben Krebszellen, verlangen naturgemäss eine grosse DNA-Produktion, da ja mit der Teilung des Kerns eine Verdopplung der DNA einhergeht. In solchen Zellen ist auch die Aktivität der Dihydrofolsäure-Reduktase gross.

Die Therapie mit Folsäureanalogen bedingt als Folge der Blockierung der Sequenz Dihydrofolsäure-Reduktase - Thymidylat-Synthetase - DNA-Synthetase den Wachstumsstillstand von mitotischem Gewebe (leukämischen Zellen). Man spricht in diesem Zusammenhang von einem "thymine less death".

Durch die Erschöpfung des FH_4 -Pools kommen aber auch die anderen, an FH_4 -Derivate gebundenen Reaktionen zum Stillstand, was die Synthese von RNA (durch Mangel an Purinbasen) und diejenige von Proteinen (durch Mangel an Glycin und Methionin) beeinträchtigt.

Um diesen unerwünschten Nebeneffekt der auf leukämische Zellen gezielten Behandlung zu verhindern, muss der Nachschub an FH_4 -Derivaten auf exogenem Weg erfolgen. Zu diesem Zweck verabreicht man heute 5-CHO- FH_4 . 5-CHO- FH_4 , das selbst am C_1 -Stoffwechsel nicht wesentlich teilnimmt, kann über die in Schema 1 dargestellten Abläufe in die erforderlichen Substrate der jeweiligen C_1 -Übertragungsreaktionen umgewandelt werden. Es wird berichtet [1][59], dass man mit 5-CH₃- FH_4 die gleichen Resultate in der Aufhebung der Toxizität von Folsäureanalogen erzielt hat, wie mit 5-CHO- FH_4 . Es wurde aber kein Grund dafür angegeben, warum letztere so bevorzugt wird.

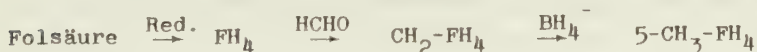
5-CHO- FH_4 und 5-CH₃- FH_4 sind beide die stabilsten FH_4 -Derivate, ein Umstand, dem bei der Handhabung von Therapeutika grosse

Bedeutung zukommt. Damit sei gesagt, dass 5-CHO-FH₄ nicht aus Stabilitätsgründen bevorzugt wird.

So bleibt noch die Zugänglichkeit der Verbindungen als Auswahlkriterium. Für 5-CHO-FH₄ bestehen eine Reihe von Synthesen [60] (und darin zitierte Literatur), die alle die Darstellung von 5-CH₃-FH₄ hinsichtlich Aufwand unterbieten. Das ist ein möglicher Grund dafür, dass 5-CH₃-FH₄ noch nicht therapeutisch angewandt wird.

2. Die Synthese von 5-CH₃-FH₄

Die meisten publizierten Methoden zur Darstellung von 5-CH₃-FH₄ erfolgen über die Reduktion von CH₂-FH₄ mit Natrium- oder Kaliumborhydrid [61 - 66].



In [67] wird die Titelverbindung über die Boranat-Reduktion von 5-CHO-FH₄ erhalten, aber nicht gereinigt. Ein japanisches Patent basiert auf der Reaktion von Dimethylsulfat mit FH₄ [68].

Wie aus dem obigen Schema ersichtlich ist, handelt es sich bei der Sequenz, die zu 5-CH₃-FH₄ führt um einfache Reaktionen. Die Öffnung des Imidazolidinrings von CH₂-FH₄ unter den angegebenen reduzierenden Bedingungen erfolgt ausschliesslich auf die 5-Seite, so dass sich keine Notwendigkeit einer Isomerentrennung ergibt.

Der Engpass, und damit auch die wesentlichen Unterschiede in den erwähnten Arbeiten, bei der Darstellung von 5-CH₃-FH₄ ist die Aufarbeitung des Reaktionsgemisch nach der Reduktion. Diese umfasst einerseits die Abtrennung der anorganischen Salze und andererseits die Entfernung von nicht charakterisierten Nebenprodukten. Zu diesem Zweck erfolgten jeweils

mehrere säulenchromatographische Reinigungsstufen an DEAE- oder TEAE-Cellulose, wobei mit pH- oder Konzentrationsgradienten eluiert wurde. Dies ist arbeits- und zeitaufwendig und erlaubt nur begrenzte Reaktionsansätze.

Durch systematische Optimierungsversuche konnte nun eine Arbeitsmethode entwickelt werden, die ohne chromatographische Aufarbeitung zu (6R,S)-5-CH₃-FH₄ führt, die alle in [61 - 66] und [69] angegebenen Reinheitskriterien erfüllt.

Die neue Methode verläuft über die oben angegebene Reaktionssequenz, derer sich auch die Autoren von [61 - 66] bedienten, jedoch mit dem Unterschied, dass die einzelnen Stufen durch Einhaltung strenger Reaktionsbedingungen so schonend durchgeführt werden konnten, dass das Endprodukt direkt in hoher Reinheit anfällt. Die optimierte Synthese unterscheidet sich von den bisherigen wie folgt:

1 Darstellung von FH₄

Die Synthese des Zwischenprodukts FH₄ erfolgt in den zitierten Arbeiten über die einstufige Reduktion von Folsäure; entweder durch katalytische Hydrierung nach [70] und [71] (in den älteren Vorschriften), oder durch die Reduktion mit Natrium- bzw. Kaliumborhydrid nach [72] und [73].

Frick [74] konnte zeigen, dass auf die angegebene Weise kein reines Produkt erhalten werden kann. FH₄ ist noch mit Folsäure verunreinigt. In der von Frick entwickelten Darstellung von FH₄ wird die Reduktion in 2 Stufen durchgeführt.

Zunächst wird aus Folsäure mit Na₂S₂O₄ 7,8-FH₂ hergestellt (nach einer modifizierten Methode von [75]), die dann mit NaBH₄ zu FH₄ umgesetzt wird.

Für die Synthese von FH₄ verwendeten wir eine modifizierte Methode nach Frick.

2. Die Reduktion von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$

Die Darstellung von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ durch die Zugabe von HCHO zu FH_4 und die anschliessende Reduktion von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ mit NaBH_4 wurde in wässriger Lösung mit oder ohne Pufferung durchgeführt. In der folgenden Aufstellung sind die molaren Verhältnisse der Reaktanden und die ungefähre Konzentration von FH_4 während der Zugabe von HCHO in 3 Arbeiten angegeben.

$[\text{FH}_4]$	FH_4	:	HCHO	:	NaBH_4	
0,05 M	1		6,6		24,6	[66]
0,1 M	1		8		20	[66a]
0,02 M	1		10		15	[65]

Aus dieser Aufstellung geht hervor, dass HCHO jeweils in Mengen eingesetzt wurde, die zur Ausbildung eines grossen Anteils an 2',8-Dihydroxymethyl- $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ (38) (Kap. B.3.) führen. Wenn auch die 2'- und 8-Hydroxymethylgruppen bei der Weiterreaktion mit NaBH_4 nicht unbedingt zu den entsprechenden Methylgruppen reduziert werden, so liegt hier möglicherweise eine Mitursache für die Bildung eines unreinigten Endprodukts.

Aus diesem Grunde verwendeten wir Formaldehyd in einem nur 20 %igen Ueberschuss, erhöhten aber die Konzentration von FH_4 auf 1 M, was im Gleichgewicht $\text{HCHO} + \text{FH}_4 \rightleftharpoons \text{CH}_2\text{-FH}_4 + \text{H}_2\text{O}$ das Vorliegen von $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ stark begünstigt.

Im weiteren geht aus der obigen Aufstellung hervor, dass das Boranat jeweils in grossem Ueberschuss eingesetzt wurde. Damit sind strenge Reaktionsbedingungen gegeben, die ebenfalls für unerwünschte Nebenprodukte verantwortlich sein können.

Wir fanden, dass bei einem molaren Verhältnis von $\text{CH}_2\text{-FH}_4 : \text{NaBH}_4 = 1 : 3$ die Reduktion der Methylenbrücke quantitativ verläuft, wenn man die Reaktionsdauer auf 12 - 15 Std. erhöht. (Ueblicherweise wird während 1 Std. reduziert).

Die Verwendung einer hochkonzentrierten Reaktionslösung ($[\text{CH}_2\text{-FH}_4] = 1 \text{ M}$; $[\text{NaBH}_4] = 3 \text{ M}$) hat den Vorteil, dass beim Neutralisieren der Lösung nach der Reduktion bei pH 8 etwa 80 % der anorganischen Salze ausfallen und so entfernt werden können.

3. Aufarbeitung

In den zitierten Arbeiten erfolgt die Reinigung von $5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ mittels Ionenaustauscherchromatographie.

Unsere Reaktionslösung enthielt nach der Zersetzung des NaBH_4 mit Säure und Entfernung der ausgefallenen Salze nur noch einen geringen anorganischen Anteil und so konnte das Produkt als Magnesiumsalz direkt ausgefällt werden.

3. Experimenteller Teil

1. Allgemeines. Die ^{15}N - und ^{13}C -FT.-NMR.-Spektren wurden auf einem Varian-XL-200-Spektrographen aufgenommen. Die Proben wurden unter Argon gemessen. Die UV-Spektren wurden auf einem Perkin-Elmer-555-Spektrophotometer gemessen. Alle Arbeiten wurden unter Argon ausgeführt. Die Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch 30 Min. mit Argon gespült. Filtrationen erfolgten entweder in einem Handschuhkasten, oder in einem grossen, mit Argon gefüllten Becherglas.

2. 7,8-Dihydro-L-folsäure-dihydrat (2). Die Synthese erfolgte nach einer Modifikation von [75].

10 g (21 mmol) L-Folsäure-dihydrat (FLUCKA AG) wurden in 175 ml Wasser suspendiert und mit 25 ml 2 N NaOH in Lösung gebracht. Dazu kam eine Lösung, die folgendermassen hergestellt wurde: 15 g Ascorbinsäure wurden in 300 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mit Natronlauge auf 4,5 eingestellt und 25 g (86 mmol) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ hinzugefügt. Nach 20 Min. wurde portionenweise 15 g Ascorbinsäure zugegeben, wobei 2 langsam ausfiel. Nach beendeter Zugabe wurde noch 10 Min. unter Kühlung im Eisbad gerührt und dann der pH-Wert mit konz. HCl auf 2,8 eingestellt. Der Niederschlag wurde filtriert, zweimal mit 100 ml Wasser gewaschen [und getrocknet (40° , 5 Std. 0,01 Torr). 8,5 g (84,5 %)].

3. (6R,S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure-dihydrat (1).

Die Synthese erfolgte nach einer Modifikation von [74].

8,5 g (17,7 mmol) getrocknetes oder ungetrocknetes 2 wurden in eine Lösung von 5 g (131,5 mmol) NaBH_4 in 150 ml Wasser eingebracht, wo 2 sich sofort unter H_2 -Entwicklung löste. Nach 30 Min. wurde das überschüssige NaBH_4 durch vorsichtige Zugabe von konz. HCl unter Eisbadkühlung zerstört und der pH-Wert auf 3,5 eingestellt, wobei 1 als weisser Niederschlag ausfiel, der abfiltriert, mit 50 ml Wasser gewaschen und getrocknet wurde (40° , 15 Std. 0,01 Torr). 6,25 g (73,2 %).

4. Magnesium-5-Methyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folat-tetrahydrat (3).

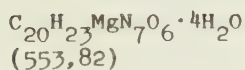
6,25 g (13 mmol) fein zerriebenes 1 wurden in 13 ml 2 N NaOH unter Verwendung eines Ultraschall-Bades ($T = 40^{\circ}$) gelöst. Dauer des Lösungsvorgangs 30 - 60 Min. Danach wurde der pH-Wert der hochviskosen Flüssigkeit mit 2 N NaOH oder 2 N HCl mit Hilfe von Universalindikatorpapier auf ca. 7 eingestellt. 1,2 ml (15,6 mmol) Formaldehyd (37 - 40 %, FLUCKA AG) wurden hinzugefügt. Nach 5 Min gab man 1,5 g (39,5 mmol) festes NaBH_4 portionenweise langsam dazu und liess das Reaktionsgemisch 15 Std. unter Inertgas stehen. Der pH-Wert wurde durch tropfenweise Zugabe von 3 N HCl unter heftigem Rühren und Kühlung im Eisbad auf 8 eingestellt. Die ausgefallenen anorganischen Salze wurden abzentrifugiert, dann wurde weiter 3 N HCl zugegeben bis pH 6. 30 mg Aktivkohle wurden der Lösung zugefügt und nach 30 Min. Rühren wurde der grösste Teil der Aktivkohle abzentrifugiert. Der Rest der Aktivkohle konnte durch Filtrieren unter Druck entfernt werden.

3 g MgCl_2 (wasserfrei) wurden im Minimum an Wasser gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Nach ca. 30 Min. begannen die ersten, farblosen Kristalle des Magnesiumsalzes von 2 auszufallen. Erst wenn die Kristallisation schon weit fortgeschritten war, wurde zur Vervollständigung der Kristallisation auf 4° gekühlt. Nach 4 Std. wurde abzentrifugiert und der Niederschlag zweimal aus 30 ml Wasser umkristallisiert und getrocknet (40° , 18 Std. 0,01 Torr). 3,3 g (45,8 %).

^{15}N -NMR. (20,2 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$, 8:92, pH = 7, 6ppm rel. ext. CH_3NO_2). N(1): -209,2; N(3): -242,0; Amid: -260,9; NH_2 : -302,6; N(8): -311,4; N(10): -312,6; N(5): -355,2.

^{13}C -NMR. (50,4 MHz, D_2O , pD = 7) $^1J_{\text{NC}}$ -Kopplungskonstanten in Hz $\pm 0,2$ Hz. N(5),C(6): 4,6; N(5),C(11): 4,3; N(10),C(4'): 13,8; N(10),C(9): 9,8.

UV. (Phosphatpuffer pH = 7). $\lambda_{\max} = 290 \text{ nm}$; $\epsilon = 29,9 \cdot 10^3$;
 $\lambda_{\min} = 245 \text{ nm}$; $\epsilon = 8,05 \cdot 10^3$; $\epsilon_{\max}/\epsilon_{\min} = 3,71$. (Der Wert des
Quotienten $\epsilon_{\max}/\epsilon_{\min}$ wird als Reinheitskriterium für 3
erachtet. Die Literaturwerte sind in [69] gesammelt).



Ber.	C 43,33	H 5,60	N 17,70%
Gef.	C 43,13	H 5,65	N 17,89%

4. Zusammenfassung

Die Synthese von 5-Methyl-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahydro-L-folsäure wurde beschrieben. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Methoden zu Darstellung der Titelverbindung kommt die optimierte Synthese ohne chromatographische Reinigung des Endprodukts aus, was eine grosse Vereinfachung bedeutet, und Makroansätze erlaubt.

D. Literaturverzeichnis

- [1] R.L. Blakley, "The Biochemistry of Folic Acid and related Pteridines", Wiley, New York, 1969
- [2] J.I. Rader und F.M. Huennekens, in "The Enzymes" (B.D. Boyer, ed.), 3. Aufl., Bd. IX, pp 197-223, Academic Press, New York, 1973
- [3] A.L. Lehninger, "Biochemistry", Worth Publishers, New York, 1975
- [4] J.C. Fontecilla-Camps, C.E. Bugg, C. Temple, J.D. Rose, J.A. Montgomery und R.L. Kisliuk, J. Amer. Chem. Soc. 101, 6114 (1979).
- [5] C.G. MacKenzie und W.R. Frisell, J. Biol. Chem. 232, 417 (1958).
- [6] W.R. Frisell und N.C. Sorrell, Biochim. Biophys. Acta 131, 207 (1967).
- [7] L.G. Schirch und M. Mason, J. Biol. Chem. 238, 1032 (1963).
- [8] P.M. Jordan und M. Akhtar, Biochem. J. 116, 277 (1970).
- [9] E. Pastore und M. Friedkin, J. Biol. Chem. 237, 3802 (1962).
- [10] M. Friedkin, in "The Kinetics of Cellular Proliferation" (F. Stohlman, Jr., ed.), p 97, Grune and Stratton, New York, 1959
- [11] D.J. Cram, "Fundamentals of Carbanion Chemistry", Kap. 1, pp 1-20, Academic Press, New York, 1965
- [12] A.L. Pogolotti, Jr. und D.V. Santi, in "Bioorganic Chemistry", (van Tamelen, ed.), Bd. 1, pp 277-311, Academic Press, London, 1977
- [13] K.H. Scheidt, Tetrahedron Lett. p 1031 (1965).
- [14] R.M. Fink, Arch. Biochem. Biophys. 107, 493 (1964).
- [15] D.V. Santi und C.F. Brewer, Biochemistry 12, 2416 (1973).

- [16] R.J. Abraham, L.D. Hall, L. Hough und K.A. McLauchlan, J.Chem. Soc. p 3699 (1962).
- [17] B.A. Otter, E.A. Falco und J.J. Fox, Tetrahedron Lett. p 2967 (1968).
- [18] D.V. Santi und C.F. Brewer, J. Amer. Chem. Soc. 90, 6236 (1968).
- [19] D.V. Santi, J. Heterocycl. Chem. 4, 475 (1967).
- [20] A.L. Pogolotti und D.V. Santi, Biochemistry 13, 456 (1974).
- [21] R.L. Blakley, Biochem. J. 58, 448 (1954).
- [22] M.J. Osborn, P.T. Talbert und F.M. Huennekens, J. Amer. Chem. Soc. 82, 4921 (1960).
- [23] S.J. Benkovic, Acc. Chem. Res. 11, 314 (1978).
- [24] W. Sakami, J. Biol. Chem. 176, 995 (1948).
- [25] W. Sakami, J. Biol. Chem. 178, 519 (1949).
- [26] P. Siekevitz und D.M. Greenberg, J. Biol. Chem. 180, 145 (1949).
- [27] G.W.E. Plaut, J.J. Bethell und H.A. Lardy, J. Biol. Chem. 184, 795 (1950).
- [28] D. Elwyn und D.B. Sprinson, J. Biol. Chem. 184, 475 (1950).
- [29] B. Kelley, Fed. Proc. 10, 206 (1951).
- [30] L. Jaenicke, Fed. Proc. 15, 281 (1956).
- [31] R.L. Kisliuk, Fed. Proc. 15, 289 (1956).
- [32] R.L. Blakley, Biochem. Biophys. Acta 23, 654 (1957).
- [33] R.L. Kisliuk, J. Biol. Chem. 227, 805 (1957).
- [34] R.L. Blakley, Nature 182, 1719 (1958).
- [35] R.L. Blakley, Biochem. J. 74, 71 (1960).
- [36] M.J. Osborn, E.N. Vercamer, P.T. Talbert und F.M. Huennekens, J. Amer. Chem. Soc. 79, 6565 (1957).
- [37] M.J. Osborn und F.M. Huennekens, Biochem. Biophys. Acta 26, 646 (1957).

- [38] R.G. Kallen und W.P. Jencks, J. Biol. Chem. 241, 5864 (1966).
- [39] R.G. Kallen und W.P. Jencks, J. Biol. Chem. 241, 5851 (1966).
- [40] W.P. Jencks, Progr. Phys. Org. Chem. 2, 63 (1964).
- [41] C.M. Tatum, P.A. Benkovic, S.J. Benkovic, R. Potts, E. Schleicher und H.G. Floss, Biochemistry 16, 1093 (1977).
- [42] S.J. Benkovic, P.A. Benkovic und D.R. Comfort, J. Amer. Chem. Soc. 91, 5270 (1969).
- [43] L.M. Jackman und S. Sternhell, "Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry", 2. Aufl., Pergamon Press, New York, 1969
- [44] M. Viscontini und J. Bieri, Helv. 55, 21 (1972)
- [45] a) W. Frick, R. Weber und M. Viscontini, Helv. 57, 2658 (1975).
b) J. A. Lyon, R.B. Dunlap und P.D. Ellis, J. Magn. Reson. 18, 293 (1975).
- [46] W. Schwotzer, J.H. Bieri, M. Viscontini und W. v. Philipsborn, Helv. 61, 2108 (1978).
- [47] G.C. Levy und R.L. Lichter, "Nitrogen-15-NMR-Spectroscopy", Wiley-Interscience, New York, 1979
- [48] G. Binsch, J.B. Lambert, B.W. Roberts und J.D. Roberts, J. Amer. Chem. Soc. 86, 5564 (1964).
- [49] M. Poe, L.M. Jackman und S.J. Benkovic, Biochem. J. 18, 5527 (1979).
- [50] C.G. Levy und Nelson, "Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists", Wiley-Interscience, New York, 1972
- [51] C.K. Cain, M.F. Mallette und E.C. Taylor, J. Amer. Chem. Soc. 68, 1996 (1946).
- [52] A. Albert, J. Appl. Chem. 3, 521 (1953).
- [53] M. Viscontini, R. Provenzale, S. Ohlgart und J. Mallevalle, Helv. 53, 1202 (1970).

- [54] M. Viscontini und J.H. Bieri, *Helv.* 54, 2291 (1971).
- [55] J.H. Bieri und M. Viscontini, *Helv.* 56, 2905 (1973).
- [56] G. Lockemann und H. Rein, *Chem. Ber.* 80, 485 (1947).
- [57] P. Carré und D. Libermann, *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci.* 199, 1422 (1934).
- [58] E. Khalifa, P.K. Sengupta, J.H. Bieri und M. Viscontini, *Helv.* 59, 242 (1976).
- [59] J.E. Gready, in "Advances in Pharmacology and Chemotherapy", Bd. 17, pp 37-102, Academic Press, London, 1980
- [60] E. Khalifa, Dissertation, Universität Zürich, 1979
- [61] W. Sakami und I. Ukstins, *J. Biol. Chem.* 236, 50 (1961).
- [62] A.R. Larrabee, S. Rosenthal, R.E. Cathou und J.M. Buchanan, *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 4094 (1961).
- [63] J.C. Keresztesy und K.O. Donaldson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5, 286 (1961).
- [64] L. Jaenicke, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 326, 168 (1961).
- [65] V.S. Gupta und F.M. Huennekens, *Arch. Biochem. Biophys.* 120, 712 (1967).
- [66] J.A. Blair und K.J. Saunders, *Anal. Biochem.* 34, 376 (1970).
- [66a] H. Rüdiger und R. Sieck, *Z. Naturforsch.* 28, 650 (1973).
- [67] I. Chanarin und J. Perry, *Biochem. J.* 105, 633 (1967).
- [68] *Chem. Abstr.* 80, 3792 (1974).
- [69] J. Conti, H. Suter und R. Widler, *Helv.* 57, 160 (1974).
- [70] B.L. O'Dell, J.M. Vanderbelt, E.S. Bloom und J.J. Pfliffner, *J. Amer. Chem. Soc.* 69, 250 (1947).
- [71] J. Hatefi, P.T. Talbert, M.J. Osborn und F.M. Huennekens, *Biochem. Prep.* 7, 89 (1960).
- [72] K.G. Scrimgeour und K.S. Vitols, *Biochemistry* 5, 1438 (1966).

- [73] M. Silvermann und J.M. Noronha, Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 180 (1961).
- [74] W. Frick, Dissertation, Universität Zürich, 1975
- [75] S. Futtermann, J. Biol. Chem. 228, 1031 (1957).
R.L. Blakley, Nature 188, 231 (1960).

Curriculum Vitae

Am 9. Dezember 1950 wurde ich, Roger Kalbermatten, in Zürich als Bürger von St. Niklaus (VS) geboren. Ich besuchte die Primarschule, 1 Jahr Realschule, 3 Jahre Sekundarschule, 4 Jahre die Kantonale Oberrealschule Zürich, 1 Semester das Institut Minerva und schloss im Frühling 1972 mit der Eidgenössischen Matura Typ C ab. Im Herbst 1973 begann ich mit dem Biochemie-Studium an der Universität Zürich, das ich im Frühling 1978 mit dem Diplom abschloss. Anschliessend begann ich mit der Dissertation in Organischer Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. M. Viscontini. Während meiner Studien besuchte ich Vorlesungen, Uebungen und Praktika bei den Dozenten Batschelet, Biegert, Brun, Christen, Dreiding, Eugster, Grauer, Hesse, Humbel, Kägi, Kläui, Labhart, Oswald, von Philipsborn Schmid, Streuli, Thomas, Viscontini, Wagnière, Wanner und Waser. Seit April 1978 bin ich Assistent im Chemiepraktikum für Mediziner.

